

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 7 月 22 日 (22.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/061108 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12,  
C07K 14/72, 16/28, C12N 5/10 // (C07K 14/72, C12R  
1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91)

本郷 2-3 2-2-1 0 2 4 Tokyo (JP). 加門 淳司 (KAMON, Junji) [JP/JP]; 〒349-0294 埼玉県 南埼玉郡 白岡町 大字白岡 1 4 7 0 日産化学工業株式会社 生物科学研究所内 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007515

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 12 日 (12.06.2003)

(74) 代理人: 早川 裕司, 外 (HAYAKAWA, Yuzi et al.); 〒107-0052 東京都 港区赤坂六丁目9番5号 氷川アネックス2号館501 アーケディア特許事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-383738  
2002 年 12 月 29 日 (29.12.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都 千代田区 丸の内 1-5-1 Tokyo (JP). 日産化学工業株式会社 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒101-0054 東京都 千代田区 神田錦町 3-7-1 興和一橋ビル Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 門脇 孝 (KADOWAKI, Takashi) [JP/JP]; 〒215-0023 神奈川県 川崎市 麻生区 片平 3-1 6-1 4 Kanagawa (JP). 山内 敏正 (YAMAUCHI, Toshimasa) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都 文京区 向丘 1-3-1-6 0 5 Tokyo (JP). 永井 良三 (NAGAI, Ryoze) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都 文京区

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ADIPONECTIN RECEPTOR AND GENE CODING FOR THE SAME

(54) 発明の名称: アディポネクチン受容体及びそれをコードする遺伝子

(57) Abstract: A novel protein having an adiponectin binding capacity provided by isolating human and mouse adiponectin receptors and identifying the same; a method of screening a ligand, agonist or antagonist for adiponectin receptor with the use of the protein; and a screening kit therefor. In particular, a novel protein having an adiponectin binding capacity, which is comprised of a protein (a) of the amino acid sequence specified in the sequence number 2, 4, 6 or 8, or a protein (b) of the amino acid sequence specified in the sequence number 2, 4, 6 or 8 wherein one or two or more amino acids have been deleted, replaced or added.

(57) 要約: ヒト及びマウスのアディポネクチン受容体を単離・同定し、アディポネクチン結合能を有する新規タンパク質を提供するとともに、該タンパク質を利用したアディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法及びスクリーニング用キットを提供することを目的とし、この目的を達成するために、アディポネクチン結合能を有する新規タンパク質として、(a) 配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、(b) 配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列において 1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアディポネクチン結合能を有するタンパク質を利用する。

WO 2004/061108 A1

## 明 細 書

## アディポネクチン受容体及びそれをコードする遺伝子

技術分野

本発明は、アディポネクチン結合能を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、及び上記タンパク質に対する抗体又はその断片に関する。さらに、本発明は、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法及びスクリーニング用キットに関する。

背景技術

肥満は、脂肪組織量の増加として定義され、糖尿病、高脂血症、冠動脈性心疾患等の心臓血管疾患及び代謝疾患の高リスクと関連する (Reaven, G.M. Diabetologia 38, 3-13. (1995); Spiegelman, B.M. ら, Cell 87, 377-389. (1996))。肥満及び2型糖尿病の顕著な特徴であるグルコース及び脂質の代謝異常は、筋肉、肝臓等のインスリン標的組織における脂質蓄積量の増加の原因となり、インスリン抵抗性を引き起こす (Ruderman, N. B. ら, Am. J. Physiol. 276, E1-E18. (1999); Shulman, G. I. J. Clin. Invest. 106, 171-176. (2000))。脂肪組織は、エネルギー要求の変化に応答してトリグリセリド (TG) を蓄積するとともに遊離脂肪酸 (FFA) / グリセロールを放出する部位としての役割を果たす (Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. Cell 87, 377-389. (1996))。また、脂肪組織は、FFA (Shulman, G.I. J. Clin. Invest. 106, 171-176. (2000))、アディプシン (White, R.T. ら, J. Biol. Chem. 267, 9210-921

3. (1992))、レプチン (Friedman, J.M. Nature 404, 632-634. (2000))、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) (Shimomura, I. ら, Nat. Med. 2, 800-803. (1996))、レジスチン (Steppan, C.M. ら, Nature 409, 307-312. (2001))、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Hotamisligil, G.S. J. Intern. Med. 245, 621-625. (1999)) 等の「アディポカイン (adipokines)」(Matsuzawa, Y. ら, Ann. NY. Acad. Sci. 892, 146-154. (1999)) と呼ばれる多数の生物活性物質を分泌する重要な内分泌器官として、様々なエネルギーホメオスタシスの調節に関与する。

アディポネクチン又はAcrp30(Hu, E., Liang, P. ら, J. Biol. Chem. 271, 10697-10703. (1996)等) は、アディポサイト由来のホルモンであり、様々な生物学的機能を有している。肥満、2型糖尿病、冠動脈性心疾患は、アディポネクチンの血漿レベルの減少に関連しており、アディポネクチンはin vitroにおいて抗アテローム発生性を示すことが報告されている (Ouchi, N. ら, Circulation 103, 1057-1063. (2001); Yokota, T. ら, Blood 96, 1723-1732. (2000))。また、Acrp30の循環レベルの急増は、肝臓におけるグルコース産生を低下させることが報告されている (Berg, A.H. ら, Nat. Med. 7, 947-953. (2001); Combs, T.P. ら, J. Clin. Invest. 108, 1875-1881. (2001))。また、globular Acrp30は、筋肉における脂肪酸酸化を亢進させ、マウスにおける体重減少を引き起こすことが報告されている (Fruebis, J. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 2005-2010. (2001))。また、脂肪組織萎縮性マウス又は肥満マウスにおけるインスリン抵抗性が、globularドメインのみからなるアディポネクチン (globular adiponectin; gAd) で処理することにより、筋肉における脂肪酸酸化の亢進を介して改善したこと、及び全長アディポネクチンで処理することにより程度はgAdよりも低い改善したことが

報告されている (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 7, 941-946. (2001))。

さらに最近になって、骨格筋において、アディポネクチンがAMPキナーゼ (AMPK) を急性的に活性化し、その結果、脂肪酸酸化及びグルコース取り込みが亢進されることが報告されているとともに (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002))、アディポネクチンがPPAR $\alpha$  を慢性的に活性化し、その結果、脂肪酸酸化が亢進されるが筋肉における組織TG含量は減少すること、そしてこれらの効果は全長アディポネクチンよりもgAdの方が大きいことが報告されている (Yamauchi, T. ら, J. Biol. Chem. 278, 2461-2468 (2002))。また、興味深いことに、肝臓においては、全長アディポネクチンのみがAMPKを急性的に活性化し、その結果、糖新生に関連する分子を減少させるとともに脂肪酸酸化を亢進させる一方、全長アディポネクチンのみがAMPKを慢性的に活性化し、その結果、脂肪酸酸化を亢進させるとともに肝臓における組織TG量を減少させる。そして、これらの変化はいずれもin vivoにおけるインスリン感受性を増加させる (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002) ; Yamauchi, T. ら, J. Biol. Chem. 278, 2461-2468 (2002))

これらのアディポネクチンの作用は、細胞表面の受容体によって媒介されると考えられるが、アディポネクチン受容体は未だ同定されておらず、骨格筋及び肝臓におけるアディポネクチン受容体が構造的及び機能的に異なるか否かも未だ不明である。なお、本発明者がアディポネクチン受容体をコードする遺伝子を同定した後、ホモロジー検索を行ったところ、ホモロジーを有する遺伝子として酵母YOL002cが発見された (Karpichev, I. V. ら, Journal of Biological Chemistry, 277, 19609-19617. (2002))。YOL002cは、脂肪酸酸化等の脂質の代謝経路において重要な役割を果たす7回膜貫通型タンパク質をコードする (Karpichev, I. V. ら, Journal of Biological Chemistry, 277, 19609-19617. (2002))。

### 発明の開示

本発明は、第一に、アディポネクチン結合能を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、及び上記タンパク質に対する抗体又はその断片を提供することを目的とする。

また、本発明は、第二に、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法及びスクリーニング用キットを提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明は、以下のタンパク質、遺伝子、組換えベクター、形質転換体、抗体、並びにアディポネクチン受容体に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法及びスクリーニング用キットを提供する。

(1) 以下の (a) 又は (b) に示すタンパク質。

(a) 配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアディポネクチン結合能を有するタンパク質

(2) 前記 (1) 記載のタンパク質をコードする遺伝子。

(3) 以下の (c) 又は (d) に示す DNA を含む前記 (2) 記載の遺伝子。

(c) 配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA

(d) 配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA と相補的な DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつアディポネクチン結合能を有するタンパク質をコードする DNA

- (4) 前記(2)又は(3)記載の遺伝子を含む組換えベクター。
- (5) 前記(4)記載の組換えベクターを含む形質転換体。
- (6) 前記(1)記載のタンパク質に反応し得る抗体又はその断片。
- (7) 試験物質と前記(1)記載のタンパク質とを接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。
- (8) 前記(1)記載のタンパク質、前記(2)若しくは(3)記載の遺伝子、前記(4)記載の組換えベクター又は前記(5)記載の形質転換体を含む、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング用キット。

#### 図面の簡単な説明

図1(a)は、アディポネクチンのC2C12筋細胞への結合を示す図、図1(b)は、アディポネクチンの肝細胞への結合を示す図、図1(c)～(e)は、FACS解析の結果を示す図、図1(f)は、AdipoR1遺伝子及びAdipoR2遺伝子の転写物の構造を示す模式図、図1(g)は、マウスの様々な組織に関するノーザンブロット解析の結果を示す図、図1(h)は、ヒトの様々な組織に関するノーザンブロット解析の結果を示す図である。

図2(a)は、AdipoR1及びAdipoR2の構造を示す模式図、図2(b)は、エピトープタグFLAGを有するAdipoR1及びAdipoR2をトランスフェクトした293T細胞の細胞溶解物を抗FLAG抗体で免疫染色した結果を示す図、図2(c)は、エピトープタグをN末端又はC末端に導入したAdipoR1又はAdipoR2をトランスフェクトした293T細胞におけるAdipoR1又はAdipoR2の細胞内局在を示す図、図2(d)は、AdipoR1及びAdipoR2の予測構造モデルを示す図である。

図3 (a) は、AdipoR1又はAdipoR2をトランスフェクトした293T細胞への [ $^{125}$ I] globular Adipo (gAd) の結合等温線 (binding isotherm) を示す図、図3 (b) は、当該293T細胞への [ $^{125}$ I] 全長Adipo (Ad) の結合等温線を示す図、図3 (c) は、エピトープタグFLAG又はHAを有するAdipoR1又はAdipoR2をトランスフェクトした293T細胞の細胞溶解物を、抗FLAG抗体又は抗HA抗体を用いて免疫沈降した後、抗FLAG抗体又は抗HA抗体で免疫染色した結果を示す図、図3 (d) は、マウスAdipoR1発現細胞又はBLT1発現細胞にglobular Adipo、全長Adipo、LTB4又はATPをチャレンジしたときの [ $\text{Ca}^{2+}$ ] <sub>i</sub> の変化を示す図、図3 (e) は、ホルスコリンで処理した又は処理しないHEK-293細胞にcAMP又はcGMPを蓄積させた結果を示す図、図3 (f) は、AdipoR1をトランスフェクトした293T細胞をglobular Adipo又は全長AdipoとインキュベートしたときのPPAR $\alpha$  リガンド活性を示す図である。

図4 (a) は、マウスAdipoR1 mRNA量を示す図、図4 (b) はマウスAdipoR2 mRNA量を示す図、図4 (c) 及び (d) は、マウスAdipoR1又はマウスAdipoR2をトランスフェクトしたC2C12筋細胞に結合した [ $^{125}$ I] globular Adipo (gAd) 又は全長Adipo (Ad) の結合等温線を示す図、図4 (e) は、マウスAdipoR1又はマウスAdipoR2をトランスフェクトしたC2C12筋細胞にLacZ又はDN- $\alpha$  2AMPKを含有するアデノウイルスを感染させ、globular Adipo又は全長Adipoで7時間処理したときのC2C12筋細胞内のPPAR $\alpha$  リガンド活性を示す図、図4 (f) は上記C2C12筋細胞内のin vitro 脂肪酸酸化を示す図である。

図5 (a) は、siRNA又はmockをトランスフェクトしたC2C12筋細胞内のマウスAdipoR1 mRNAの量を示す図、図5 (b) は、上記C2C12筋細胞内のマウスAdipoR2 mRNAの量を示す図、図5 (c) は、非標識globular Adipoの濃度を増加させることによって、二本鎖siRNAをトランスフェクト

した細胞に結合する $[^{125}\text{I}]$ globular Adipoを置換した競合ラジオリガンド結合アッセイの結果を示す図、図5 (d)は、非標識全長Adipoの濃度を増加させることによって、二本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞に結合する $[^{125}\text{I}]$ 全長Adipoを置換した競合ラジオリガンド結合アッセイの結果を示す図、図5 (e)は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞への $[^{125}\text{I}]$ globular Adipoの結合等温線を示す図、図5 (f)は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞への $[^{125}\text{I}]$ 全長Adipoの結合等温線を示す図、図5 (g)は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞をglobular Adipo、全長Adipo又はWy-14, 643と7時間インキュベートしたときのPPAR $\alpha$ リガンド活性を示す図、図5 (h)は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞をglobular Adipo、全長Adipo又はWy-14, 643と7時間インキュベートしたときのin vitro 脂肪酸酸化を示す図、図5 (i)は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞をglobular Adipo、全長Adipo又はインスリンと7時間インキュベートしたときのグルコース取り込みを示す図である。

図6 (a)は、gAdの肝細胞への特異的結合を示す図、図6 (b)は、Adの肝細胞への特異的結合を示す図、図6 (c)は、HAECにおけるヒトAdipoR1 mRNAの発現レベルを示す図、図6 (d)は、HAECにおけるヒトAdipoR2 mRNAの発現レベルを示す図、図6 (e)は、gAdのHAECへの特異的結合を示す図、図6 (f)は、AdのHAECへの特異的結合を示す図である。

図7 (a)は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞への $[^{125}\text{I}]$ globular Adipoの結合等温線 (binding isotherm) を示す図、図7 (b)は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞への $[^{125}\text{I}]$ 全長Adipoの結合等温線 (binding isotherm) を示す図、図7 (c)は、図7 (a)に示す結果に基づきスキッチャードプロット解析を行った



結果を示す図、図 7 (d) は、図 7 (b) に示す結果に基づきスキッチャードプロット解析を行った結果を示す図である。

図 8 (a) は、AdipoR1をトランスフェクトした又はしていないC2C12細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化AMPK抗体とを反応させた結果を示す図、図 8 (b) は、AdipoR1をトランスフェクトした又はしていないC2C12細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化ACC抗体とを反応させた結果を示す図、図 8 (c) は、AdipoR1をトランスフェクトした又はしていないC2C12細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化p38 MAPK抗体とを反応させた結果を示す図、図 8 (d) は、AdipoR1をトランスフェクトした又はしていないC2C12細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化MAPK抗体とを反応させた結果を示す図、図 8 (e) は、AdipoR1をトランスフェクトした又はしていない肝細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化AMPK抗体とを反応させた結果を示す図、図 8 (f) は、AdipoR1をトランスフェクトした又はしていない肝細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化ACC抗体とを反応させた結果を示す図、図 8 (g) は、優性阻害型AMPキナーゼ (DN-AMPK) 又はp38 MAPK特異的阻害剤 SB203580の存在下におけるAdipoR1をトランスフェクトした又はしていないC2C12筋細胞の脂肪酸酸化を示す図、図 8 (h) は、優性阻害型AMPキナーゼ (DN-AMPK) 又はp38 MAPK特異的阻害剤 SB203580の存在下におけるAdipoR1をトランスフェクトした又はしていないC2C12筋細胞のグルコース取り込みを示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明のタンパク質は、以下の（a）又は（b）に示すタンパク質である。

（a）配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質（以下「タンパク質（a）」という。）

（b）配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアディポネクチン結合能を有するタンパク質（以下「タンパク質（b）」という。）

タンパク質（a）又は（b）は、アディポネクチン結合能を有するタンパク質である。「アディポネクチン結合能」とは、アディポネクチンと結合する能力、好ましくはアディポネクチンと特異的に結合する能力（すなわちアディポネクチン受容体が有するアディポネクチン結合能）を意味する。「アディポネクチン結合能」には、全長アディポネクチン又は globular ドメインのみからなるアディポネクチンのいずれに対する結合能も含まれる。アディポネクチン結合能を有するタンパク質には、全長アディポネクチンにのみ結合し得るタンパク質、globular ドメインのみからなるアディポネクチンにのみ結合し得るタンパク質、全長アディポネクチン及び globular ドメインのみからなるアディポネクチンの両者に結合し得るタンパク質、全長アディポネクチン及び globular ドメインのみからなるアディポネクチンのいずれか一方に優先的に結合し得るタンパク質等が含まれる。

なお、「globular ドメイン」とは、アディポネクチンの C 末端側に約 100 アミノ酸長の長さで存在する糸状体類似の構造ドメインである。補体の C1q 等にも globular ドメインとホモロジーの高いドメインが存在す

る。アディポネクチンのglobularドメインは機能的には骨格筋等に強く作用して、脂肪酸を燃焼させ、脂肪が蓄積するのを抑制する作用を有しており、全長のアディポネクチンより数十分の一の低い濃度で同程度の強い活性を示す。

タンパク質 (a) のうち、配列番号 2 又は 4 に記載のタンパク質はヒト由来のアディポネクチン受容体であり、配列番号 6 又は 8 に記載のタンパク質はマウス由来のアディポネクチン受容体である。また、配列番号 2 及び 6 に記載のタンパク質は同一種類のアディポネクチン受容体 (AdipoR1) であり、配列番号 4 及び 8 に記載のタンパク質は、AdipoR1とは異なる種類のアディポネクチン受容体 (AdipoR2) である。AdipoR1は、全長アディポネクチンよりもglobularドメインのみからなるアディポネクチンに対して比較的選択性を有する受容体であると考えられ、AdipoR2は、globularドメインのみからなるアディポネクチンよりも全長アディポネクチンに対して比較的選択性を有する受容体であると考えられる。

AdipoR1について、ヒト (配列番号 2) 及びマウス (配列番号 6) 間のアミノ酸レベルでの相同性は 96.8% である。AdipoR2について、ヒト (配列番号 4) 及びマウス (配列番号 8) 間のアミノ酸レベルでの相同性は 95.2% である。AdipoR1とAdipoR2の構造は類似しており、マウスにおけるAdipoR1 (配列番号 6) 及びAdipoR2 (配列番号 8) の相同性は 66.7% である。

生体において、AdipoR1はほとんどの組織で発現しており、特に骨格筋で高度に発現している一方、AdipoR2は肝臓で高度に発現している。また、AdipoR1及びAdipoR2は、ホモ又はヘテロマルチマーを形成していると考えられる。また、AdipoR1及びAdipoR2はともに、全長アディポネクチン及びglobularドメインのみからなるアディポネクチンと結合し、これらのアディポネクチンによるPPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activa

ted receptor  $\alpha$  : ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\alpha$ ) リガンド活性及び脂肪酸酸化の亢進を媒介する。例えば、AdipoR1は、globularドメインのみからなるアディポネクチンによる筋細胞内のPPAR  $\alpha$  リガンド活性、脂肪酸酸化及びグルコース取り込みの増加を媒介すると考えられる。また、AdipoR2は、全長アディポネクチンによる肝細胞及び筋細胞内のPPAR  $\alpha$  リガンド活性及び脂肪酸酸化の増加を一部媒介すると考えられる。

AdipoR1及びAdipoR2はいずれも7個の膜貫通ドメインを有すると考えられる。配列番号2記載のアミノ酸配列(ヒトAdipoR1)のうち、136～158番目、172～194番目、207～228番目、234～255番目、267～289番目、299～321番目、336～358番目のアミノ酸配列が膜貫通ドメインに相当すると考えられる。また、配列番号4記載のアミノ酸配列(ヒトAdipoR2)のうち、60～82番目、96～118番目、130～152番目、158～179番目、192～214番目、222～244番目、260～282番目のアミノ酸配列が膜貫通ドメインに相当すると考えられる。また、配列番号6記載のアミノ酸配列(マウスAdipoR1)のうち、136～158番目、172～194番目、207～228番目、234～255番目、267～289番目、299～321番目、336～358番目のアミノ酸配列が膜貫通ドメインに相当すると考えられる。また、配列番号8記載のアミノ酸配列(マウスAdipoR2)のうち、72～94番目、108～130番目、142～164番目、170～191番目、204～226番目、234～256番目、272～294番目のアミノ酸配列が膜貫通ドメインに相当すると考えられる。

配列番号2、4、6又は8に記載のアミノ酸配列において欠失、置換又は付加されるアミノ酸の個数は、アディポネクチン結合能が保持され

得る限り特に限定されるものではなく、その個数は1又は複数個、好ましくは1又は数個であり、その具体的な範囲は通常1～100個、好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～10個である。このとき、タンパク質(b)のアミノ酸配列は、タンパク質(a)のアミノ酸配列と通常60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有する。

配列番号2、4、6又は8に記載のアミノ酸配列において欠失、置換又は付加されるアミノ酸の位置は、アディポネクチン結合能が保持される限り特に限定されるものではない。

タンパク質(b)には、タンパク質(a)に対して人為的に欠失、置換、付加等の変異を導入したタンパク質の他、欠失、置換、付加等の変異が導入された状態で天然に存在するタンパク質や、それに対して人為的に欠失、置換、付加等の変異を導入したタンパク質も含まれる。欠失、置換、付加等の変異が導入された状態で天然に存在するタンパク質としては、例えば、ヒトを含む哺乳動物(例えば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット等)由来のタンパク質(これらの哺乳動物において多型によって生じ得るタンパク質を含む)が挙げられる。

タンパク質(a)及び(b)には、糖鎖が付加されたタンパク質及び糖鎖が付加されていないタンパク質のいずれもが含まれる。タンパク質に付加される糖鎖の種類、位置等は、タンパク質の製造の際に使用される宿主細胞の種類によって異なるが、糖鎖が付加されたタンパク質には、いずれの宿主細胞を用いて得られるタンパク質も含まれる。また、タンパク質(a)及び(b)には、その医薬的に許容される塩も含まれる。

タンパク質(a)又は(b)をコードする遺伝子は、例えば、ヒト、マウス等の哺乳動物の骨格筋、肝臓、心臓、マクロファージ、血管、脳、

腎臓、肺、胎盤、脾臓、精巣、末梢血液、胸腺、腸管等の組織から抽出したmRNAを用いてcDNAライブラリーを作製し、配列番号1、3、5又は7に記載の塩基配列に基づいて合成したプローブを用いて、cDNAライブラリーから目的のDNAを含むクローンをスクリーニングすることにより得られる。以下、cDNAライブラリーの作製、及び目的のDNAを含むクローンのスクリーニングの各工程について説明する。

〔cDNAライブラリーの作製〕

cDNAライブラリーを作製する際には、例えば、ヒト、マウス等の哺乳動物の骨格筋、肝臓、心臓、マクロファージ、血管、脳、腎臓、肺、胎盤、脾臓、精巣、末梢血液、胸腺、腸管等の組織から全RNAを得た後、オリゴdTセルロースやポリUセファロース等を用いたアフィニティーカラム法、バッチ法等によりポリ(A<sup>+</sup>)RNA(mRNA)を得る。この際、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A<sup>+</sup>)RNA(mRNA)を分画してもよい。次いで、得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。このようにして得られた二本鎖cDNAを適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製し、該組換えベクターを用いて大腸菌等の宿主細胞を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を選択することにより、cDNAのライブラリーが得られる。cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターは、宿主細胞中で自立複製できるものであればよく、例えば、ファージベクター、プラスミドベクター等を使用できる。宿主細胞としては、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)等を使用できる。

大腸菌等の宿主細胞の形質転換は、塩化カルシウム、塩化マグネシウム又は塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に、組換

えベクターを加える方法等により行うことができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合は、テトラサイクリン、アンピシリン等の薬剤耐性遺伝子を含有させておく。

cDNAライブラリーの作製にあたっては、市販のキット、例えば、SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Gibco BRL社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (ストラタジーン社製)等を使用できる。

〔目的のDNAを含むクローンのスクリーニング〕

cDNAライブラリーから目的のDNAを含むクローンをスクリーニングする際には、配列番号1、3、5又は7に記載の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、これを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、PCR増幅断片を得る。PCR増幅断片は、適当なプラスミドベクターを用いてサブクローニングしてもよい。PCRに使用するプライマーセットは特に限定されるものではなく、配列番号1、3、5又は7に記載の塩基配列に基づいて設計できる。

cDNAライブラリーに対して、PCR増幅断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション又はプラークハイブリダイゼーションを行うことにより、目的のDNAが得られる。プローブとしては、PCR増幅断片をアイソトープ(例えば、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ )、ビオチン、ジゴキシゲニン、アルカリホスファターゼ等で標識したものを使用できる。目的のDNAを含むクローンは、抗体を用いたイムノスクリーニング等の発現スクリーニングによっても得られる。

取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのまま、又は適当な制限酵素等で切断した後、常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、マキシムーギルバートの化学修飾法、ジデオキシヌクレオチド鎖終結法を用いて決定できる。塩基配列解析の

際には、通常、373A DNAシーケンサー (Perkin Elmer社製) 等の塩基配列分析装置が用いられる。

タンパク質 (a) 又は (b) をコードする遺伝子は、タンパク質 (a) 又は (b) をコードするオープンリーディングフレームとその3'末端に位置する終止コドンとを含む。また、タンパク質 (a) 又は (b) をコードする遺伝子は、オープンリーディングフレームの5'末端及び/又は3'末端に非翻訳領域 (UTR) を含むことができる。

タンパク質 (a) をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号1、3、5又は7に記載の塩基配列からなるDNAを含む遺伝子が挙げられる。ここで、配列番号1に記載の塩基配列のうち1～1125番目の塩基配列は、配列番号2に記載のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームであり、配列番号1に記載の塩基配列のうち、翻訳開始コドンは1～3番目の塩基配列に位置し、終止コドンは1126～1128番目の塩基配列に位置する。また、配列番号3に記載の塩基配列のうち1～897番目の塩基配列は、配列番号4に記載のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームであり、配列番号3に記載の塩基配列のうち、翻訳開始コドンは1～3番目の塩基配列に位置し、終止コドンは898～900番目の塩基配列に位置する。また、配列番号5に記載の塩基配列のうち1～1125番目の塩基配列は、配列番号6に記載のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームであり、配列番号5に記載の塩基配列のうち、翻訳開始コドンは1～3番目の塩基配列に位置し、終止コドンは1126～1128番目の塩基配列に位置する。また、配列番号7に記載の塩基配列のうち1～933番目の塩基配列は、配列番号8に記載のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームであり、配列番号7に記載の塩基配列のうち、翻訳開始コドンは1～3番目の塩基配列に位置し、終止コドンは934～936番目の塩基配列に位置する。



タンパク質 (a) をコードする遺伝子の塩基配列は、タンパク質 (a) をコードする限り特に限定されるものではなく、オープンリーディングフレームの塩基配列は、配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列に限定されるものではない。タンパク質 (a) をコードする遺伝子は、その塩基配列に従って化学合成により得ることもできる。DNA の化学合成は、市販の DNA 合成機、例えば、チオホスファイト法を利用した DNA 合成機 (島津製作所社製)、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 (パーキン・エルマー社製) を用いて行うことができる。

タンパク質 (b) をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA と相補的な DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつアディポネクチン結合能を有するタンパク質をコードする DNA を含む遺伝子が挙げられる。

「ストリンジントな条件」としては、例えば、42℃、2×SSC 及び 0.1% SDS の条件、好ましくは 65℃、0.1×SSC 及び 0.1% SDS の条件が挙げられる。

配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA と相補的な DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA の具体例としては、配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA と少なくとも 60% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上の相同性を有する DNA が挙げられる。

タンパク質 (b) をコードする遺伝子は、例えば、配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA に、部位特異的変異誘発法等の公知の方法を用いて人為的に変異を導入することにより得られる。変異の導入は、例えば、変異導入用キット、例えば、Mutant-K (TAKARA 社製)、Mutant-G (TAKARA 社製)、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて行うことができる。また、塩基配列が既に決

定されているDNAについては化学合成によっても得られる。

タンパク質(a)又は(b)は、例えば、以下の工程に従って、それぞれのタンパク質をコードする遺伝子を宿主細胞中で発現させることにより製造できる。

〔組換えベクター及び形質転換体の作製〕

組換えベクターを作製する際には、目的とするタンパク質のコード領域を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、目的とするタンパク質のコード領域の塩基配列を、宿主細胞における発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換したDNAを調製する。

このDNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより組換えベクターを作製し、該組換えベクターを適当な宿主細胞に導入することにより、目的とするタンパク質を生産し得る形質転換体を得られる。上記DNA断片は、その機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要であり、ベクターは、プロモーターの他、エンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー（例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子）、リボソーム結合配列（SD配列）等を含むことができる。

発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製が可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等を使用できる。プラスミドベクターとしては、例えば、大腸菌由来のプラスミド（例えば、pRSET、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19）、枯草菌由来のプラスミド（例えば、pUB110、pTP5）、酵母由来のプラスミド（例えば、YEp13、YEp24、YCp50）が挙げられ、ファージベクターとしては、例えば、λファージ（例えば、Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP）が挙げられ、

ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスが挙げられる。

宿主細胞としては、目的とする遺伝子を発現し得る限り、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等のいずれを使用してもよい。また、動物個体、植物個体、カイコ虫体等を使用してもよい。

細菌を宿主細胞とする場合、例えば、エッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ (*Rhizobium meliloti*) 等のリゾビウム属に属する細菌を宿主細胞として使用できる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* K12、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101等の大腸菌や、*Bacillus subtilis* MI 114、*Bacillus subtilis* 207-21等の枯草菌を宿主細胞として使用できる。この場合のプロモーターは、大腸菌等の細菌中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーターを使用できる。また、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーターも使用できる。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入し得る方法であれば特に限定されず、例えば、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等を使用できる。

酵母を宿主細胞とする場合、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シズサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces*

s pombe)、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等を宿主細胞として使用できる。この場合のプロモーターは、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等を使用できる。

酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入し得る方法であれば特に限定されず、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を使用できる。

動物細胞を宿主細胞とする場合、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等を宿主細胞として使用できる。この場合のプロモーターは、動物細胞中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTR(Long Terminal Repeat)プロモーター、CMVプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を使用できる。

動物細胞への組換えベクターの導入方法は、動物細胞にDNAを導入し得る方法であれば特に限定されず、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を使用できる。

昆虫細胞を宿主とする場合には、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を宿主細胞として使用できる。*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等が挙げられる。

昆虫細胞への組換えベクターの導入方法は、昆虫細胞にDNAを導入

し得る限り特に限定されず、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等を使用できる。

#### 〔形質転換体の培養〕

目的とするタンパク質をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを導入した形質転換体を通常の培養方法に従って培養する。形質転換体の培養は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌や酵母等の微生物を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを使用してもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を使用できる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸又は有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物等を使用できる。無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を使用できる。

大腸菌や酵母等の微生物を宿主細胞として得られた形質転換体の培養は、振盪培養又は通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は通常25～37℃、培養時間は通常12～48時間であり、培養期間中はpHを6～8に保持する。pHの調整は、無機酸、有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行うことができる。また、培養の際、必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリン等の抗

生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、EagleのMEM培地、DMEM培地、Ham F12培地、Ham F12K培地又はこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を使用できる。形質転換体の培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で3～10日間行う。また、培養の際、必要に応じてカナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（ファーミンジェン社製）、Sf-900 II SFM培地（Gibco BRL社製）、ExCell400、ExCell405（JRHBioサイエンス社製）等を使用できる形質転換体の培養は、通常27℃で3～10日間行う。また、培養の際、必要に応じてゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

目的とするタンパク質は、分泌タンパク質又は融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、例えば、β-ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ（Arg）、ポリ（Glu）、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖（His-tag）、Sペプチド、

DNA結合タンパク質ドメイン、T a c 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン等が挙げられる。

〔タンパク質の単離・精製〕

形質転換体の培養物より目的とするタンパク質を採取することにより、目的とするタンパク質が得られる。ここで、「培養物」には、培養上清、培養細胞、培養菌体、細胞又は菌体の破砕物のいずれもが含まれる。

目的とするタンパク質が形質転換体の細胞内に蓄積される場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に細胞を破砕して、目的とするタンパク質を抽出する。目的とするタンパク質が形質転換体の細胞外に分泌される場合には、培養上清をそのまま使用するか、遠心分離等により培養上清から細胞又は菌体を除去する。

こうして得られるタンパク質（a）又は（b）は、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）ーセファロース、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法、ゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法等により精製できる。

タンパク質（a）又は（b）は、そのアミノ酸配列に基づいて、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造できる。この際、市販のペプチド合成機を使用できる。

本発明の抗体又はその断片は、タンパク質（a）又は（b）に反応し得る抗体又はその断片である。ここで、「抗体」には、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれもが含まれ、「モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体」には全てのクラスのモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が含まれる。また、「抗体」には、ウサギやマウス等の

免疫動物にタンパク質 (a) 又は (b) のタンパク質を免疫して得られる抗血清、ヒト抗体、遺伝子組換えによって得られるヒト型化抗体も含まれる。また、「抗体の断片」には、Fab断片、F(ab)'<sub>2</sub>断片、単鎖抗体(scFv)等が含まれる。

本発明の抗体又はその断片は、タンパク質 (a) 又は (b) を免疫用抗原として利用することより作製できる。免疫用抗原としては、例えば、(i) タンパク質 (a) 又は (b) を発現している細胞又は組織の破砕物又はその精製物、(ii) 遺伝子組換え技術を用いて、タンパク質 (a) 又は (b) をコードする遺伝子を大腸菌、昆虫細胞又は動物細胞等の宿主に導入して発現させた組換えタンパク質、(iii) 化学合成したペプチド等を使用できる。

ポリクローナル抗体の作製にあたっては、免疫用抗原を用いて、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ウシ等の哺乳動物を免疫する。免疫動物は、抗体を容易に作製できることからマウスを利用することが好ましい。免疫の際には、抗体産生誘導する為に、フロイント完全アジュバント等の免疫助剤を用いてエマルジョン化した後、複数回の免疫することが好ましい。免疫助剤としては、フロイント完全アジュバント(FCA)の他、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムゲル等を利用できる。哺乳動物 1 匹当たりの抗原の投与量は、哺乳動物の種類に応じて適宜設定できるが、マウスの場合には通常 50 ~ 500  $\mu$ g である。投与部位は、例えば、静脈内、皮下、腹腔内等である。免疫の間隔は、通常、数日から数週間間隔、好ましくは 4 日 ~ 3 週間間隔で、合計 2 ~ 8 回、好ましくは 2 ~ 5 回免疫を行う。そして、最終免疫日から 3 ~ 10 日後に、タンパク質 (a) 又は (b) に対する抗体力価を測定し、抗体力価が上昇した後に採血し、抗血清を得る。抗体力価の測定は、酵素免疫測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)等に



より行うことができる。

抗血清から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して又はこれらを組み合わせて利用できる。

モノクローナル抗体の作製にあたっては、ポリクローナル抗体の場合と同様に免疫用抗原を用いて哺乳動物を免疫し、最終免疫日から2～5日後に抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞としては、例えば、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞が一般的に利用される。

次いで、ハイブリドーマを得るために、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、ヒト、マウス等の哺乳動物由来の細胞であって一般に入手可能な株化細胞を利用できる。利用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態では選択培地(例えばHAT培地)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞の具体例としては、P3X63-Ag. 8. U1 (P3U1)、P3/NSI/1-Ag4-1、Sp2/0-Ag14等のマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地等の動物細胞培養用培地中に、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを所定の割合(例えば1:1～1:10)で混合し、ポリエチレングリコール等の細胞融合促進剤の存在下で、又は電気パルス処理(例えばエレクトロポレーション)により融合反応を行う。

細胞融合処理後、選択培地を用いて培養し、目的とするハイブリドーマを選別する。次いで、増殖したハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマの

スクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウエルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法 (ELISA)、放射性免疫測定法 (RIA) 等によってスクリーニングできる。

ハイブリドーマのクローニングは、例えば、限界希釈法、軟寒天法、フィブリング法、蛍光励起セルソーター法等により行うことができ、最終的にモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得する。

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法等を利用することができる。細胞培養法においては、例えばハイブリドーマを10～20%牛胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地等の動物細胞培養培地中、通常の培養条件(例えば37℃, 5%CO<sub>2</sub>濃度)で3～10日間培養することにより、その培養上清からモノクローナル抗体を取得することができる。また、ハイブリドーマをマウス等の腹腔内に移植し、10～14日後に腹水を採取し、当該腹水からモノクローナル抗体を取得することもできる。

モノクローナル抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して又はこれらを組み合わせて利用できる。

モノクローナル抗体をヒトに投与する目的(抗体治療)で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体又はヒト型化抗体を使用することが好ましい。ヒト抗体又はヒト型化抗体は、例えば、免疫動物としてヒト抗体遺伝子を導入したマウス等を用いてハイブリドーマを製作することにより、また、ファージ上に抗体を提示したライブラリーを用いることにより取得できる。具体的には、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に、抗原となるタンパク質、タン

パク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて目的のタンパク質に対するヒト抗体を取得できる（国際公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W096-33735及びW096-34096参照）。また、複数の異なるヒトscFvをファージ上に提示させた抗体ライブラリーから、抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物に結合する抗体を提示しているファージを選り分けることで、目的のタンパク質に結合するscFvを選択できる（Griffiths, 等, EMBO J. 12, 725-734, 1993）。

本発明のスクリーニング方法は、試験物質とタンパク質（a）又は（b）とを接触させる工程を含む。本発明のスクリーニング方法によれば、試験物質とタンパク質（a）又は（b）とを接触させ、試験物質がタンパク質（a）又は（b）に結合するか否かを判別することにより、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングできる。スクリーニングされた物質は、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストとしての作用を実際に有するか否かを判別する工程にさらに供することが好ましい。

試験物質の種類は特に限定されるものではないが、例えば、高分子化合物、低分子化合物、細胞培養物、組織抽出物等が挙げられる。

スクリーニングの際には、タンパク質（a）又は（b）として、例えば、(i) タンパク質（a）又は（b）を発現している細胞若しくは組織又はそれらの処理物 (ii) DNA組換え技術を用いて、タンパク質（a）又は（b）をコードするDNAを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等の宿主に導入して発現させた組換えタンパク質、(iii) 化学合成したペプチド等を使用できる。タンパク質（a）又は（b）を発現している細胞又は組織は、タンパク質（a）又は（b）を内因性タンパク質とし

て発現している細胞又は組織（例えば、筋細胞、骨格筋、心臓、マクロファージ、血管、脳、腎臓、肺、胎盤、脾臓、精巣、末梢血液、胸腺、腸管等）であってもよいし、外因性タンパク質として発現している細胞又は組織（例えば、タンパク質（a）又は（b）をコードするDNAを導入した大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等）であってもよい。また、細胞又は組織の処理物は、細胞又は組織に、破砕、抽出、精製等の処理を施したものであり、細胞又は組織の処理物としては、例えば、細胞又は組織の細胞膜画分が挙げられる。

試験物質がアディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストとしての作用を有するか否かは、例えば、タンパク質（a）又は（d）に対する試験物質の結合量、試験物質とタンパク質（a）又は（b）との結合により生じる細胞応答の有無又は程度に基づいて判別できる。

タンパク質（a）又は（b）に対する試験物質の結合量は、例えば、標識した試験物質、試験物質に対する標識抗体等を使用して測定できる。標識としては、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等の放射性同位体元素、蛍光色素等を使用できる。放射性同位体元素の放射活性は、例えば、液体シンチレーションカウンター、X線フィルム、イメージングプレート等を用いて測定でき、蛍光色素の蛍光強度は、例えば、CCDカメラ、蛍光スキャナー、分光蛍光光度計等を用いて測定できる。

試験物質とタンパク質（a）又は（b）との結合により生じる細胞応答としては、例えば、PPAR $\alpha$ リガンド活性の亢進又は抑制、脂肪酸酸化の亢進又は抑制、グルコース取り込みの亢進又は抑制、細胞内pHの上昇又は低下、AMPキナーゼ活性の増加又は低下、AMPキナーゼのリン酸化の増加又は低下、p38 MAPキナーゼ活性の増加又は低下、p38 MAPキナーゼのリン酸化の増加又は低下、糖新生の促進又は抑制、脱共役蛋白の増加

又は低下等が挙げられる。

タンパク質（a）又は（b）に対する試験物質の結合量の測定、及び細胞応答の有無又は程度の測定にあたっては、タンパク質（a）又は（b）の存在下及び不存在下における測定値を比較することが好ましい。

脂肪細胞は主要なインスリン感受性ホルモンとしてアディポネクチンを分泌し、脂肪細胞肥大はアディポネクチン分泌低下を惹起し、アディポネクチン分泌低下はインスリン抵抗性を惹起する。そして、インスリン抵抗性は、糖尿病、高脂血症、高血圧を惹起する。また、アディポネクチン分泌低下は動脈硬化を促進させる。したがって、アディポネクチン受容体に対するアゴニスト又はアンタゴニストとしてスクリーニングされた物質は、例えば、インスリン抵抗性改善薬、糖尿病予防・治療薬、高脂血症予防・治療薬、高血圧予防・治療薬、動脈硬化予防・治療薬、肥満予防・治療薬、抗炎症薬、骨粗鬆症予防・治療薬、抗癌剤等として使用できる。

これらの薬剤はスクリーニングされた物質のみから構成してもよいが、通常は、薬学的に許容され得る賦形剤その他任意の添加剤を用いて製剤化する。製剤化にあたっては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、注射剤用溶剤等の添加剤を使用できる。投与経路としては、例えば、経口投与、非経口投与（例えば、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与等）が挙げられ、投与剤形としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、懸濁剤等が挙げられる。投与量及び投与回数は、目的とする作用効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、体重、性別等により異なり、スクリーニングされた物質の種類に応じて適宜調節できる。

タンパク質（a）又は（b）、タンパク質（a）又は（b）をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター又は該組換えベクターを

含む形質転換体は、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング用キットの構成要素として利用できる。これらは、タンパク質 (a) 又は (b) の供給源としてスクリーニング用キットに含まれる。

スクリーニング用キットは、タンパク質 (a) 又は (b)、タンパク質 (a) 又は (b) をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター又は該組換えベクターを含む形質転換体を含む限り、いかなる形態であってもよく、各種試薬 (例えば、緩衝液等)、測定機械器具、標識化合物、モデル動物、細胞株、細胞培養用培地等を含むことができる。

#### 〔実施例〕

以下、実施例に関する本文及び図において、アディポネクチンを「Adipo」と、globularドメインのみからなるアディポネクチンを「globular Adipo」又は「gAd」と、全長アディポネクチンを「全長Adipo」又は「Ad」という場合がある。また、アディポネクチン受容体を「AdipoR」と、ヒト由来アディポネクチン受容体を「hAdipoR」と、マウス由来アディポネクチン受容体を「mAdipoR」という場合がある。また、「AdipoR1」及び「AdipoR2」はアミノ酸配列が異なるアディポネクチン受容体を表す。

### 1. 実験方法

#### (1) レトロウイルスの作製及び感染

レトロウイルス含有上清を作製するために、リポフェクタミンPLUS (Life Technologies) を用いて、 $10^7$ 個のPlat-E packaging細胞 (Morita, S.ら, Gene Ther. 7, 1063-1066 (2000)) に、ヒト骨格筋cDNAライブラリー (Clontech)  $10 \mu\text{g}$ を一過性にトランスフェクトした。24時間インキュベーションした後、上清 (10mL) を回収した。Ba/F3細胞に、ポリプレ

ン (hexadimethrine, Sigma) 10  $\mu$ g/mL を添加した 1/20 倍希釈上清 (推定 m.o.i=0.3) を感染させた。6 時間後、培養液を交換し、Ba/F3 細胞を 6 日間培養して増殖させた後、冷凍保存又は細胞選別を行った。

## (2) FACS 解析及び cDNA の配列決定

FACS 解析は、Stoecklin らの方法 (Stoecklin, G. ら, EMBO J. 21, 47 09-4718. (2000)) に従って行った。細胞選別のために、ヒト骨格筋 cDNA ライブラリーをトランスフェクトした Ba/F3 細胞  $1 \times 10^7$  個から FACVantage (Becton Dickinson) を用いて細胞を濃縮した。細胞を回収し、増殖させた後、11 日後に FACS 解析に供した。選別された細胞をさらに増殖して FACS 解析に供した。選別された細胞に組み込まれた cDNA の配列決定を行うために、レトロウイルスベクターに対する上流及び下流のプライマーを用いて、選別された細胞から抽出されたゲノム DNA 50ng を鋳型として PCR を行い、得られた PCR 増幅断片の配列決定を行った。

PCR は、Taq ポリメラーゼ (Perkin-Elmer/Cetus) を用いて、94°C で 1 分間、56°C で 2 分間、72°C で 3 分間のサイクルを 35 サイクル行った。レトロウイルスベクターに対するプライマー (pLIB プライマー) は以下のとおりである。

5' プライマー : 5' - agccctcactccttctctag -3'

3' プライマー : 5' - acctacaggtggggtctttcattccc -3'

PCR 産物は、プライマーを除去した後、BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems) を用いた direct sequence により塩基配列を決定した。

## (3) ノーザンプロット解析

ヒトの様々な組織 (脳、心臓、骨格筋、大腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、末梢血白血球) のノーザンプロットフィルター I

及びIIをClonetechより購入した。これらのフィルターを、4×SSC、5×Denhardt's溶液、0.2% SDS、200mg/mL サケ精子DNA、及び50% ホルムアミドを含有するハイブリダイゼーション緩衝液中、42℃で24時間、 $[^{32}\text{P}]$  dCTP 標識したcDNAプローブ（ヒトAdipoR1 cDNA、マウスAdipoR1 cDNA、ヒト又はマウスAdipoR2 cDNAをそれぞれPstI/BstXI、BamHI/PstI、EcoRV/NotIを処理して得られた断片）とハイブリダイズさせた。0.1×SSC、0.1% SDS、65℃の条件でフィルターを洗浄した後、オートラジオグラフィに供した。同様のノーザンブロット解析をマウスの様々な組織（脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、骨格筋、脾臓、精巣）についても行った。

#### （４）哺乳動物細胞におけるタンパク質の発現及び性状決定

AdipoR1 cDNA又はAdipoR2 cDNAをpCXN2 (Kinoshita, S. ら, Pharm. Res. 15, 1851-1856 (1998))のEcoRV/NotI部位にライゲートすることにより、AdipoR1又はAdipoR2 発現ベクターを構築した。HEK-293T (human embryonic kidney cells: ヒト胎児腎臓細胞)、HAEC (Normal Human Aortic Endothelial Cells: 正常ヒト大動脈内皮細胞) 及びC2C12筋細胞（マウス筋細胞株）をDMEM中で培養した。培養液には、10% ウシ胎児血清 (FCS) を含有させた。DNAトランスフェクションは、いずれの細胞についても、リポフェクタミンPLUS (Gibco BRL) を用いたリポフェクションによって行った。

#### （５）C2C12筋細胞におけるRNA干渉 (RNA interference)

Karpichevらの方法 (Karpichev, I. V. ら, J. Biol. Chem. 277, 19609-19617 (2002)) に従い、二組のsiRNAを化学合成し、アニーリングさせ、リポフェクタミンPLUS (Life Technologies) を用いて、コンフルエントから2日後にウマ血清含有DMEMで4～7日間培養して筋管細胞に分化



させたC2C12筋細胞にトランスフェクトした。肝細胞又はHAECについても同様にsiRNAをトランスフェクトした。siRNAのトランスフェクション48時間後、細胞を溶解した。

無関係なコントロールsiRNA (siRNA unrelated) の塩基配列は次のとおりである。

Unrelated-sense : gugcgcugcuggugccaaccctt

Unrelated-antisense : ggguuggcaccagcagcgcaatt

マウスAdipoR1遺伝子のコーディング領域に対応するsiRNA (siRNA mAdipoR1) の塩基配列は次のとおりである。

siRNA mAdipoR1-sense : gagacuggcaacaucuggacatt

siRNA mAdipoR1-antisense : uguccagauguugccagucuctt

マウスAdipoR2遺伝子のコーディング領域に対応するsiRNA (siRNA mAdipoR2) の塩基配列は次のとおりである。

siRNA mAdipoR2-sense : gcuuagagacaccuguuuguutt

siRNA mAdipoR2-antisense : aacaaacaggugucucuaagctt

ヒトAdipoR1遺伝子のコーディング領域に対応するsiRNA (siRNA hAdipoR1) の塩基配列は次のとおりである。

siRNA hAdipoR1-sense : ggacaacgacuaucugcuacatt

siRNA hAdipoR1-antisense : uguagcagauagucguugucctt

ヒトAdipoR2遺伝子のコーディング領域に対応するsiRNA (siRNA hAdipoR2) の塩基配列は次のとおりである。

siRNA hAdipoR2-sense : ggaguuucguuucgaugaucggtt

siRNA hAdipoR2-antisense : ccgaucagaacgaacacucctt

(6) PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  : ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\alpha$ ) リガンド活性の測定

大腸菌を用いて発現させたマウス globular Adipo 及び全長 Adipo を、Yamauchi らの方法 (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002)) に従って精製した。Yamauchi らの方法 (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002)) に従って、分化した C2C12 筋細胞又は単離した肝細胞を所定濃度のアディポネクチンで処理した。PPAR $\alpha$  リガンド活性は、Yamauchi らの方法 (Yamauchi, T. ら, J. Biol. Chem. 278, 2461-2468 (2002)) に従って、(UAS)  $\times$  4-tk-LUC リポータープラスミド、GAL4-rat PPAR $\alpha$  リガンド結合ドメイン発現プラスミド、及び  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現プラスミド (内部コントロール) を用いて定量した。

#### (7) 脂質及びグルコース代謝

Yamauchi らの方法 (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 7, 941-946. (2001)) に従って、細胞溶解物を用いて [ $^{1-14}\text{C}$ ] パルミチン酸からの [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{CO}_2$  産生を測定した。また、Yamauchi らの方法 (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002)) に従って、グルコース取り込みを測定した。

#### (8) 優性阻害型 (dominant negative) AMPキナーゼ (AMPK) を用いた研究

$\alpha 2$  AMPK (45番目のリジン残基がアルギニン残基に置換された変異を含む) をコードする cDNA を DN- $\alpha 2$ AMPK として用いた (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002))。C2C12 筋細胞に、コントロール Mock ベクター又は DN- $\alpha 2$ AMPK を含有する等しい力価のアデノウイルスを感染させた。Yamauchi らの方法 (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002)) に従って、分化の誘導の 5 日後に、細胞を所定濃度のアディポネクチンで処理して、PPAR $\alpha$  リガンド活性及び脂肪酸酸化を測定した。

### (9) 結合アッセイ

合成ヒト又はマウスAdipoのTyrを、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  (2000Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) の存在下、IODO-ビーズ(Pierce)により $^{125}\text{I}$ で標識した。組換えglobular Adipo又は全長AdipoをNHS-LC-ビオチン (Pierce) を用いてビオチン化した。細胞を96wellプレート上に $4.1 \times 10^4$ 個/wellの密度で播き、一晚培養した後、培養液を除去し、細胞を37℃で一晩、所定濃度の [ $^{125}\text{I}$ ] Adipo及び非標識競合物質を含有する結合アッセイ用緩衝液 (HEPES緩衝化生理食塩水/0.1%ウシ血清アルブミン) とインキュベートした。その後、Yamauchiらの方法 (Yamauchi, T.ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002); Yokomizo, T.ら, Nature 387, 620-624 (1997)) に従って、細胞を氷冷リン酸緩衝化生理食塩水で3回洗浄し、0.1N NaOH/0.1% SDSで溶解し、細胞に結合した放射活性をγカウンターで測定した。

### (10) 蛍光顕微鏡による解析

AdipoR1又はAdipoR2の細胞内局在を、293T細胞を用いて、共焦点蛍光顕微鏡により評価した。細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定した後、5倍希釈した透過緩衝液 (permeabilization buffer) (Coulter) を用いて透過させて又は透過させずに、抗FLAG抗体 (M2;  $30 \mu\text{g/mL}$ ) と22℃で1時間インキュベートした。次いで、AlexFluor 488を結合させた二次抗体 $10 \mu\text{g/mL}$ とともにインキュベートした。次いで、ニコン顕微鏡及びクリプトン/アルゴンレーザー (488nm) を備えたレーザスキャンニング顕微鏡システムを用いて共焦点イメージングを行った。

(11) AdipoR1遺伝子及びAdipoR2遺伝子の転写物のリアルタイムPCRによる定量的解析

Heidらの方法(Heid, C.A.ら, Genome Res. 6, 986-994 (1996))に従って、ヒトAdipoR1遺伝子、ヒトAdipoR2遺伝子、マウスAdipoR1遺伝子及びマウスAdipoR2遺伝子に関する4種類の転写物の定量をリアルタイムPCRによって行った。それぞれの転写物に関するプライマー及びプローブは以下のとおりである。PCR産物は、ABI PRISM7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて連続的に測定した。それぞれの転写物の相対量をアクチンの転写物量に対して標準化した。

[マウスAdipoR1遺伝子]

forward プライマー: 5' - acgttgagagtcacccgtat -3'

reverse プライマー: 5' - ctctgtgtggatgcggaagat -3'

プローブ: 5' - cctgctacatggccacagaccacct -3' (minor groove binderを担持)

[マウスAdipoR2遺伝子]

forward プライマー: 5' - tcccaggaagatgaagggtttat -3'

reverse プライマー: 5' - ttccattcgttcgatagcatga-3'

プローブ: 5' - atgtccccgctcctacaggccc -3' (minor groove binderを担持)

[ヒトAdipoR1遺伝子]

forward プライマー: 5' - ttcttcctcatggctgtgatgt -3'

reverse プライマー: 5' - aagaagcgcgcaggaattcg -3'

プローブ: 5' - tcactggagctggcctttatgctgc -3' (minor groove binderを担持)

[ヒトAdipoR2遺伝子]

forward プライマー: 5' - atagggcagataggctggttga -3'

reverse プライマー: 5' - ggatccgggcagcataca -3'

プローブ: 5' - ctgatggccagcctctacatcacagga -3' (minor groove binder)

rを担持)

(12) 細胞内カルシウム濃度、cAMP量及びcGMP量の測定

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は、Yokomizoらの方法 (Yokomizo, T.ら, Nature 387, 620-624 (1997)) に従って測定した。すなわち、細胞に、Hepes-Tyrode's BSA緩衝液(25mM Hepes-NaOH(pH 7.4), 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.0mM CaCl<sub>2</sub>, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.6mM D-グルコース, 0.37mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.49mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% [wt/vol] 脂肪酸不含BSA; Fraction V) に溶解した10  $\mu$ M Fura-2 AM (Dojin) を37°Cで2時間接触させた。細胞を2回洗浄し、Hepes-Tyrode's BSA緩衝液に10<sup>6</sup>細胞/mLの濃度で懸濁させた。0.5mLの細胞懸濁液をCAF-100 system (Jasco) にアプライし、5  $\mu$ Lのリガンドのエタノール溶液 (LTB<sub>4</sub>用) 又はPBS溶液 (Adipo用) を加えた。340nm及び380nmの励起光によって発せられる500nmの蛍光の割合に基づいて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した。

また、cAMP量及びcGMP量は、Yokomizoらの方法 (Yokomizo, T.ら, Nature 387, 620-624 (1997)) に従い、アッセイキット (cAMP: Biotrak cAMP EIAシステム, cGMP: Biotrak cGMP EIAシステム) (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、製造業者のプロトコルに基づき測定した。

(13) AdipoR1及びAdipoR2の構造予測

Kyte-Doolittleのハイドロパシーインデックスを用いて、AdipoR1及びAdipoR2タンパク質のハイドロパシープロット (hydropathy plot) を行った。また、AdipoR1及びAdipoR2の構造モデルをSOSUIによって予測し、PRINTS (<http://bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/>) によってコンセンサス配列を解析した。さらに、リン酸化部位をDNASIS Pro. によって解析した。さらに、AdipoR1/R2がその他のクラスのGPCRとホモロジーを有

するか否かを<http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/AllAll.html>に記載の方法により解析した。

(14) AMPキナーゼ (AMPK)、ACC、p38 MAPキナーゼ (p38 MAPK) 及びMAPキナーゼ (MAPK) のリン酸化及びリン酸化量の測定

AMPK、ACC (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002)), p38 MAPK及びMAPK (Barger, P.M. ら, J. Biol. Chem. 276, 44495-44501 (2001); Puigserver, P. ら, Mol. Cell 8, 971-982 (2001); Michael, L.F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 3820-3825 (2001)) のリン酸化及びリン酸化量を、抗リン酸化AMPK抗体、抗リン酸化ACC抗体、抗リン酸化p38 MAPK抗体又は抗リン酸化MAPK抗体を利用したウェスタンブロッティング法により測定した。この際、AdipoR1をトランスフェクトした又はしていないC2C12細胞又は肝細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、各細胞の溶解物と各抗体とを反応させた。

## 2. 結果

### (1) AdipoR1及びAdipoR2の発現クローニング

筋肉において、globular Adipoは全長Adipoよりもインスリン抵抗性を改善させ、PPAR $\alpha$  及び脂肪酸酸化を活性化させる (Fruebis, J. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98, 2005-2010 (2001); Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 7, 941-946 (2001); Yamauchi, T. ら, J. Biol. Chem. 278, 2461-2468 (2002))。さらに、globular Adipoは全長AdipoよりもC2C12筋細胞に強く結合するとともに、肝細胞及び肝臓の膜よりも骨格筋の膜に強く結合する (Yamauchi, T. ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002)) (図1a, b参照)。図1aは、globular Adipo又は全長AdipoとC2C

12筋細胞との結合、図1 bはglobular Adipo又は全長Adipoと肝細胞との結合を示す。細胞は、図示する濃度のビオチン化globular Adipo又は全長Adipoとともにインキュベートし、細胞表面に結合したビオチン化globular Adipo又は全長AdipoはELISAにより定量した。図中のそれぞれのバーは平均値 $\pm$ s.e. (n=3-5)を示し、「※」は $P<0.05$ 、「※※」は $P<0.01$ を示す。

そこで、ヒト骨格筋のmRNA由来のcDNAを組み込んだレトロウイルスをBa/F3細胞に感染させて作製したライブラリーから、globular Adipoに対する結合能を有するタンパク質をスクリーニングすることにより、AdipoR1のcDNAの単離を試みた。

感染させたBa/F3細胞を回収し、ビオチン化したglobular Adipoとインキュベートした後、ストレプトアビジンを結合させたフィコエリトリン (phycoerythrin: PE) (赤色蛍光プローブ) で染色し、蛍光活性化セルソーター (fluorescence-activated cell sorting: FACS) に供した (図1 c 参照)。FACS解析の結果を図1 c, d, eに示す。図1 cは、感染後であるが、第一の選別前のBa/F3細胞を示し、図1 dは、第三の選別前のBa/F3細胞を示し、図1 eは、FITC (fluorescein isothiocyanate) を結合させたglobular Adipoとインキュベートした後であるが、第四の選別前のBa/F3細胞を示す。また、図1 c, d, eにおいて、四角で囲まれた領域は、AdipoR1陽性細胞を示し、四角内の細胞は選別された細胞を示す。

選別されたglobular Adipo結合能を有する細胞を第二ラウンド目の選別に供した。再選別されたglobular Adipo結合能を有する細胞 (図1 d 参照) を第三ラウンド目の選別に供し、再選別された細胞を直ちにFITC (fluorescein isothiocyanate) (緑色蛍光プローブ) を結合させたglobular Adipoとインキュベートした。赤色から緑色に変化した細胞がglo

bular Adipoに対する特異的結合部位を有する細胞であるから(図 1 e 参照)、そのように変化した細胞のみを選別し、さらなる分析のために培養により増殖させた。これらの細胞から抽出したゲノムDNAを、ウイルスベクターに対するプライマーを用いたPCRに供し、配列決定した。

なお、上記のように細胞を二色(赤色及び緑色)で染色したのは、gl obular Adipoがその粘着性によって非特異的に結合した細胞を除去するためである。

配列決定されたヒトAdipoR1 cDNAの塩基配列を配列番号 1 に示し、それにコードされるタンパク質(ヒトAdipoR1)のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。また、C2C12筋細胞から同様の方法によって取得したマウスAdipoR1 cDNAの塩基配列を配列番号 5 に示し、それにコードされるタンパク質(マウスAdipoR1)のアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。ヒトAdipoR1 cDNA(配列番号 1)及びマウスAdipoR1 cDNA(配列番号 5)は、375 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であることが判明した(図 1 f 参照)。ヒトAdipoR1及びマウスAdipoR1のアミノ酸配列の相同性は96.8%である(図 1 f 参照)。図 1 f は、データベース(NIH-MGC Project and NCBI contig)におけるAdipoR1遺伝子及びAdipoR2遺伝子の転写物の模式的構造を示す。

これまでの知見(Yamauchi, T.ら, Nat. Med. 8, 1288-1295. (2002) ; Yamauchi, T.ら, J. Biol. Chem. 278, 2461-2468 (2002)) から、Ad ipoRには、globular Adipo又は全長Adipoに対する結合親和性が異なる 2 種類のタイプ、すなわち、骨格筋で発現するglobular Adipoに優先的に結合するタイプと、肝臓で発現する全長Adipoにのみ結合するタイプとが存在すると考えられる。

AdipoR1とホモロジーを有するタンパク質を調査したところ、ヒト及びマウスに関するデータベース(The Human Genome, <http://www.ncbi.nl>



m.nih.gov/genome/guide/human/ ; Mouse Genome Resources, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) (Waterston, R.H. ら, Nature 420, 520-562 (2002) ; Okazaki, Y. ら, Nature 420, 563-573 (2002)) において、AdipoR1 cDNAとは異なるオープンリーディングフレーム (ORF) を有する遺伝子が発見された。そこで、このcDNAをHepG2細胞 (ヒト肝癌由来細胞株) のmRNAからクローニングし、配列決定し、このcDNAにコードされているタンパク質をAdipoR2と名付けた。配列決定されたヒトAdipoR2 cDNAの塩基配列を配列番号3に示し、それにコードされるタンパク質 (ヒトAdipoR2) のアミノ酸配列を配列番号4に示す。また、C2C12筋細胞から同様の方法によって取得したマウスAdipoR2 cDNAの塩基配列を配列番号7に示し、それにコードされるタンパク質 (マウスAdipoR2) のアミノ酸配列を配列番号8に示す。

ヒトAdipoR2及びマウスAdipoR2のアミノ酸配列の相同性は95.2%である。また、AdipoR1及びAdipoR2は構造的に高度に類似しており、マウスAdipoR1及びAdipoR2のアミノ酸配列の相同性は66.7%である。

SWISS-PROTにおいて、AdipoR1及びAdipoR2と相同性が高い哺乳動物のタンパク質は存在しなかったが、興味深いことに、AdipoR1及びAdipoR2をコードするcDNAは、酵母YOL002c (Karpichev, I.V. ら, J. Biol. Chem. 277, 19609-19617. (2002)) とホモロジーを有していた。YOL002cは、脂肪酸酸化等の脂質の代謝経路において重要な役割を果たす7回膜貫通型タンパク質をコードすると報告されている (Karpichev, I.V. ら, J. Biol. Chem. 277, 19609-19617 (2002))。種を問わず、7回膜貫通構造を有するAdipoR/YOL002cは、脂肪酸酸化等の脂肪代謝において重要な制御シグナルを媒介すると考えられる。

## (2) AdipoR1及びAdipoR2の組織分布

マウスの様々な組織に関するノーザンブロット解析の結果を図 1 g に示し、ヒトの様々な組織に関するノーザンブロット解析の結果を図 1 h に示す。図 1 g 中、レーン 1 は脳、レーン 2 は心臓、レーン 3 は腎臓、レーン 4 は肝臓、レーン 5 は肺、レーン 6 は骨格筋、レーン 7 は脾臓、レーン 8 は精巣の結果を示し、図 1 h 中、レーン 1 は脳、レーン 2 は心臓、レーン 3 は骨格筋、レーン 4 は大腸、レーン 5 は胸腺、レーン 6 は脾臓、レーン 7 は腎臓、レーン 8 は肝臓、レーン 9 は小腸、レーン 10 は胎盤、レーン 11 は肺、レーン 12 は末梢血白血球の結果を示す。

ヒト及びマウスの様々な組織に関するノーザンブロット解析によって、上記データベースにおいて予測された mRNA のサイズを有する 2.0kb の一本の主要なバンドが同定され、AdipoR1 がほとんどの組織で発現しており、骨格筋において高度に発現していることが明らかになった。また、上記データベースにおいて予測された mRNA のサイズを有する 4.0kb の一本の主要なバンドが同定され、AdipoR2 が肝臓において高度に発現していることが明らかになった。

### (3) AdipoR1 及び AdipoR2 の細胞内局在

マウス AdipoR1 の推定アミノ酸配列（配列番号 6）から、マウス AdipoR1 は 375 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、その分子量は 42.4kDa と予測される。また、マウス AdipoR2 の推定アミノ酸配列（配列番号 8）から、マウス AdipoR2 は 311 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、その分子量は 35.4kDa と予想される（図 2 a 参照）。図 2 a は、ソフトウェア PRINTS (<http://bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/>) によって AdipoR の配列をスキャンした結果であり、図中、下線領域は、AdipoR1 及び AdipoR2 の 7 個の膜貫通ドメインを示し、太字の下線部は、G タンパク質結合受容体のメンバーに特徴的な保存モチーフを示す。また、図 2 a に

は、PKCリン酸化部位及びチロシンリン酸化部位も併せて示す。

AdipoR1及びAdipoR2の推定アミノ酸配列からAdipoR1及びAdipoR2は、7個の膜貫通ドメインを有するタンパク質であると予測される（図2a参照）。AdipoR1又はAdipoR2について、7個の膜貫通ドメインを有する公知の受容体（Waterston, R.H. ら, Nature 420, 520-562 (2002); Okazaki, Y. ら, Nature 420, 563-573 (2002); Wess, J., FASEB. J. 11, 346-354 (1997)) とのアライメントを行ったが、Gタンパク質結合受容体（G-protein coupled receptor: GPCR）ファミリーに属するメンバーとのアミノ酸配列の相同性は低かった。AdipoR1及びAdipoR2は、Gタンパク質結合受容体ファミリーの特徴（例えば、保存アミノ酸、グリコシル化部位、Gタンパク質結合部位）（Wess, J. ら FASEB. J. 11, 346-354 (1997); Yokomizo, T. ら, Nature 387, 620-624 (1997); Scheer, A. ら, EMBO. J. 15, 3566-3578 (1996)) が欠落していた。Gタンパク質結合受容体ファミリーにおいて高度に保存されているアミノ酸のうち、AdipoR1及びAdipoR2の第一及び第二細胞外ループにおいて高度に保存されている2個のCys残基のうちの1つのみが存在していた。AdipoR1及びAdipoR2は、TM7の末端に存在する高度に保存されたAsn-Pro-Xaa2-Tyrモチーフを欠落していた。また、AdipoR1及びAdipoR2のTM3/細胞内ループ2トランジションに存在する高度に保存されたAsp-Arg-Tyrモチーフ（Wess, J. ら FASEB. J. 11, 346-354 (1997); Scheer, A. ら, EMBO. J. 15, 3566-3578 (1996)) も欠落していた。

エピトープタグFLAGで標識したヒト及びマウスのAdipoR1又はAdipoR2をHEK-293T細胞中で発現させ、抗FLAG抗体で免疫染色した。ヒト及びマウスAdipoR1及びAdipoR2は、予想された分子量を示した（図2b参照）。

マウスAdipoR1又はAdipoR2の細胞内局在及びトポロジーを調べるために、いずれかの末端にエピトープタグを有するAdipoR1又はAdipoR2のcD

NAをHEK-293T細胞で発現させた（図2c参照）。図2c中、「intact」は細胞を透過させなかった場合、「permeabilized」は細胞を透過させた場合を表す。

エピトープタグをN末端に導入した場合には、細胞を透過させたときのみ、細胞表面に存在するAdipoR1及びAdipoR2を検出できた（図2c参照）。これに対して、エピトープタグをC末端に導入した場合には、細胞表面に存在するAdipoR1及びAdipoR2を検出できた（図2c参照）。これらの結果は、AdipoR1及びAdipoR2が7個の膜貫通ドメインを有する膜内在性タンパク質であり、そのN末端は膜内に存在し、そのC末端は膜外に存在することを示す（図2c, d参照）。これは、これまでに報告されている全てのGタンパク質結合受容体（Wess, J. ら FASEB. J. 11, 346-354 (1997) ; Yokomizo, T. ら, Nature 387, 620-624 (1997) ; Scheer, A. ら, EMBO. J. 15, 3566-3578 (1996)）と反対のトポロジーである。なお、図2dは、AdipoR1及びAdipoR2の予測構造モデルである。

#### （4）293T細胞におけるAdipoRの発現の効果

AdipoR1又はAdipoR2を細胞表面上に過剰発現させた293T細胞を用いて、globular Adipo又は全長Adipoにより亢進される結合活性及び細胞内シグナルを調べた。293T細胞におけるAdipoR1又はAdipoR2の発現は、globular Adipo及び全長Adipoの両者の結合を亢進させた（図3a, b参照）。図3aは、AdipoR1又はAdipoR2をトランスフェクトした293T細胞への [ $^{125}$ I] globular Adipo (gAd) の結合等温線 (binding isotherm) を示し、図3bは、当該293T細胞への [ $^{125}$ I] 全長Adipo (Ad) の結合等温線 (binding isotherm) を示し、図中、□はMock、■はマウスAdipoR1、●はマウスAdipoR2に関する結果を示す。

次に、AdipoR1及びAdipoR2がマルチマー (multimer) を形成するかど

うかを調べた。エピトープタグFLAGを有するAdipoR1及びエピトープタグHAを有するAdipoR1とともにHEK-293T細胞中で発現させた場合には、抗HA抗体を用いた免疫沈降において、エピトープタグFLAGを有するAdipoR1が検出された（図3 c 参照）。図3 c は、エピトープタグFLAG又はHAを有するAdipoR1又はAdipoR2をトランスフェクトした293T細胞の細胞溶解物を、抗FLAG抗体（上側及び下側のパネル）を用いて免疫沈降（IP）した後、抗FLAG抗体（上側のパネル）又は抗HA抗体（下側のパネル）で免疫染色した結果であり、AdipoR1及びAdipoR2によるホモ-及びヘテロ-マルチマーの形成を示す。

さらに、エピトープタグHAを有するAdipoR1及びエピトープタグFLAGを有するAdipoR2とともにHEK-293T細胞中で発現させた場合には、抗HA抗体を用いた免疫沈降において、エピトープタグFLAGを有するAdipoR2が検出された（図3 c 参照）。これらの結果は、AdipoR1及びAdipoR2がホモ-及びヘテロ-マルチマーの両者を形成する可能性を示す。

GPCR又はLTB4受容体BLT1を発現させた細胞では、LTB4により細胞内カルシウムが増加し、AdipoR1を発現する細胞の発現レベルと類似する発現レベルを示したが（データは示さず）、AdipoR1を発現する細胞では、Adipoによる細胞内カルシウムの変化は観察されなかった（図3 d 参照）。図3 d は、Fura-2/AMをロードしたマウスAdipoR1発現細胞又はBLT1発現細胞に、10  $\mu$ g/mL globular Adipo (gAd)、10  $\mu$ g/mL 全長Adipo (Ad)、1  $\mu$ M LTB4又は100  $\mu$ M ATPをチャレンジし、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した結果である。

さらに、AdipoR1を発現する細胞において、AdipoR1はcAMP及びcGMPレベルに対して全く影響しないか、ほとんど影響を与えなかった（図3 e 参照）。図3 e はホルスコリン (forskolin) で処理した又は処理しないHEK-293細胞にcAMP又はcGMPを蓄積させた結果であり、図中、「gAd0.01」、

「gAd0.1」はそれぞれ0.01、0.1  $\mu$ g/mLのglobular Adipoを表し、「Ad1」、  
「Ad10」はそれぞれ1、10  $\mu$ g/mLの全長Adipoを表す。対照的に、AdipoR  
1の発現は、globular Adipo及び全長Adipoによる293T細胞内のPPAR $\alpha$ リ  
ガンド活性の増加を増強した（図3 f 参照）。図3 f は、AdipoR1をトラ  
ンスフェクトした293T細胞を図示する濃度（ $\mu$ g/mL）のglobular Adipo  
又は全長AdipoとインキュベートしたときのPPAR $\alpha$ リガンド活性を示し、  
図中、「gAd0.1」、「gAd0.5」、「gAd2.5」はそれぞれ0.1、0.5、2.5  $\mu$ g/mL  
のglobular Adipoを表し、「Ad1」、「Ad5」、「Ad25」はそれぞれ1、5、25  
 $\mu$ g/mLの全長Adipoを表す。また、図中、各バーは平均値 $\pm$ s.e.（n=3-5  
）を表し、「※」はP<0.05を表し、「※※」はP<0.01を表す。

#### （5）C2C12筋細胞におけるPPAR $\alpha$ 活性化及び脂肪酸酸化

C2C12筋細胞におけるAdipoR1の発現（図4 a 参照）は、globular Adi  
po及び全長Adipoの両方の結合を促進させ（図4 c, d 参照）、globular  
Adipo及び全長AdipoによるC2C12筋細胞内のPPAR $\alpha$ リガンド活性（図4 e  
参照）及び脂肪酸酸化（図4 f 参照）の増加と関連した。また、C2C12  
筋細胞におけるAdipoR2の発現（図4 b 参照）は、globular Adipo及び全  
長Adipoの両方の結合を促進させ（図4 c, d 参照）、globular Adipo及  
び全長AdipoによるC2C12筋細胞内の脂肪酸酸化の亢進（図4 f）に関連  
した。図4 a はマウスAdipoR1 mRNA量を示し、図4 b はマウスAdipoR2  
mRNA量を示し、図中、□はMock、■はマウスAdipoR1、点線を引いた□は  
マウスAdipoR2に関する結果を示す。また、図4 c 及び d は、マウスAdi  
poR1又はマウスAdipoR2をトランスフェクトしたC2C12筋細胞に結合した  
〔<sup>125</sup>I〕 globular Adipo (gAd) 又は全長Adipo (Ad) の結合等温線 (bin  
ding isotherm) を示し、図中、□はMock、■はマウスAdipoR1、●はマ  
ウスAdipoR2に関する結果を示す。また、図4 e は、マウスAdipoR1又は

マウスAdipoR2をトランスフェクトしたC2C12筋細胞に、LacZ又はDN- $\alpha$ 2 AMPKを含有するアデノウイルスを感染させ、図示する濃度 ( $\mu$ g/mL) の globular Adipo又は全長Adipoで7時間処理したときの、当該C2C12筋細胞内のPPAR $\alpha$ リガンド活性を示し、図中、□はMock、■はマウスAdipoR1に関する結果を示す。また、図4fは、上記C2C12筋細胞内のin vitro 脂肪酸酸化を示し、図中、□はMock、■はマウスAdipoR1、点線を引いた□はマウスAdipoR2に関する結果を示す。なお、各図中、各バーは平均値  $\pm$  s.e. (n=3-5) を表し、「※」はP<0.05を表し、「\*\*\*」はP<0.01を表す。

優性阻害型 (dominant negative: DN) AMPキナーゼの発現は、globular Adipo及び全長Adipo誘導性であってAdipoR1発現依存的なPPAR $\alpha$ リガンド活性の亢進に影響を与えなかった。これらの結果は、AdipoR1及びAdipoR2はともに、globular Adipo及び全長Adipoの結合を媒介し、globular Adipo及び全長AdipoによるPPAR $\alpha$ リガンド活性及び脂肪酸酸化を亢進させることを示す。

#### (6) 筋細胞内のAdipoRの結合及び作用に対するsiRNAの影響

筋細胞において、内因性のAdipoR1及びAdipoR2がAdipoの特異的結合及び代謝的作用を媒介しているか否かを調べるため、siRNAを用いてAdipoR1及びAdipoR2の発現を抑制した (図5a, b参照)。図5aは、siRNA又はmockをトランスフェクトしたC2C12筋細胞内のマウスAdipoR1 mRNAの量を示し、図5bは、当該C2C12筋細胞内のマウスAdipoR2 mRNAの量を示す。また、図5a, b中、レーン1はmock、レーン2は無関係なsiRNA、レーン3はマウスAdipoR1遺伝子に対するsiRNA、レーン4はマウスAdipoR2遺伝子に対するsiRNAを用いた場合の結果を示す。

C2C12筋細胞において、siRNAによりAdipoR1の発現を抑制すると (図5a参照)、globular Adipoの結合活性は全く観察されなくなり、全長Adi

poの結合活性は一部低下した(図5 c, d 参照)。図5 cは、非標識globular Adipoの濃度を増加させることによって、二本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞に結合する $[^{125}\text{I}]$ globular Adipoを置換した競合ラジオリガンド結合アッセイの結果( $n=4$ )であり、図5 dは、非標識全長Adipoの濃度を増加させることによって、二本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞に結合する $[^{125}\text{I}]$ 全長Adipoを置換した競合ラジオリガンド結合アッセイの結果( $n=4$ )である。

globular Adipo又は全長Adipoで7時間処理すると、C2C12細胞において、PPAR $\alpha$ リガンド活性が増加し(図5 g 参照)、脂肪酸酸化が亢進し(図5 h 参照)、グルコース取り込みが亢進した(図5 i 参照)。図5 gは、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞を、図示する濃度( $\mu\text{g/mL}$ )のglobular Adipo又は全長Adipo、あるいは $10^{-5}$  M Wy-14,643(図中「Wy」と記載)と7時間インキュベートしたときのPPAR $\alpha$ リガンド活性を示す。図5 hは、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞を、図示する濃度( $\mu\text{g/mL}$ )のglobular Adipo又は全長Adipo、あるいは $10^{-5}$  M Wy-14,643(図中「Wy」と記載)と7時間インキュベートしたときのin vitro 脂肪酸酸化を示す。図5 iは、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞を、図示する濃度( $\mu\text{g/mL}$ )のglobular Adipo又は全長Adipo、あるいは $10^{-7}$  M インスリン(図中「Ins」と記載)と7時間インキュベートしたときのグルコース取り込みを示す。図5 g~iにおいて、「gAd0.01」、「gAd0.03」、「gAd0.1」、「gAd0.5」、「gAd2.5」はそれぞれ0.01、0.03、0.1、0.5、2.5  $\mu\text{g/mL}$ のglobular Adipoを表し、「Ad0.1」、「Ad0.3」、「Ad1」、「Ad5」、「Ad25」はそれぞれ0.1、0.3、1、5、25  $\mu\text{g/mL}$ の全長Adipoを表す。図中、各バーは平均値 $\pm$ s.e. ( $n=3-5$ )を表し、「※」は $P<0.05$ 、「※※」は $P<0.01$ を表す。また、図5 g~iにおいて、□は無関係なsiRNA、■はマウスAdipoR1に対するsiRNA、点線を引いた□



はマウスAdipoR2に対するsiRNA、斜線を引いた□はマウスAdipoR1及びマウスAdipoR2に対するsiRNAを用いたときの結果を示す。

C2C12筋細胞において、siRNAによりAdipoR1の発現を抑制すると（図5 a 参照）、globular AdipoによるPPAR $\alpha$ リガンド活性（図5 g 参照）、脂肪酸酸化（図5 h 参照）及びグルコース取り込み（図5 i 参照）の増加が減少した。これに対して、AdipoR1の発現を抑制しても、全長Adipoによるこれらの作用の有意な減少は観察されなかった。したがって、AdipoR1は、globular Adipoによる筋細胞内のPPAR $\alpha$ リガンド活性、脂肪酸酸化及びグルコース取り込みの増加を媒介していると考えられる。

内因性のAdipoR2が、筋細胞におけるAdipoの特異的結合及び代謝的作用を媒介しているか否かを調べるため、siRNAを用いてAdipoR2の発現を抑制した（図5 b 参照）。C2C12筋細胞において、siRNAによってAdipoR2の発現を抑制すると（図5 b 参照）、globular Adipo及び全長Adipoの結合が一部減少した（図5 e, f 参照）。さらに、AdipoR2の発現抑制によって、全長AdipoによるPPAR $\alpha$ リガンド活性（図5 g 参照）及び脂肪酸酸化（図5 h 参照）の亢進が部分的に減少した。したがって、AdipoR2は、全長Adipoによる筋細胞内のPPAR $\alpha$ リガンド活性、脂肪酸酸化の亢進を部分的に媒介していると考えられる。図5 e は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞への $[^{125}\text{I}]$ globular Adipoの結合等温線（binding isotherm）を示し、図5 f は、二本鎖siRNAをトランスフェクトしたC2C12筋細胞への $[^{125}\text{I}]$ 全長Adipoの結合等温線（binding isotherm）を示す。なお、図中、□は無関係なコントロールsiRNA、●はマウスAdipoR2に対するsiRNA、▲はマウスAdipoR1及びマウスAdipoR2に対するsiRNAを用いた場合の結果を示す。

AdipoR1は、globular Adipoに対して比較的選択性を有する受容体であり、AdipoR2は全長Adipoに対して比較的選択性を有する受容体であると

考えられる。しかしながら、いずれのタイプのAdipoRの機能的発現を抑制しても、globular Adipo及び全長Adipoの両者に対する有意な影響が観察される。これらの結果は、AdipoR1及びAdipoR2は、ホモマルチマー及びヘテロマルチマーの両者を形成しているという結果（図3 e 参照）によって説明され得る。

興味深いことに、C2C12筋細胞において、AdipoR1及びAdipoR2の両者の発現をsiRNAにより同時に抑制すると、globular Adipo及び全長Adipoの両者の結合がほとんど観察されなくなるとともに（図5 e, f 参照）、globular Adipo及び全長AdipoによるPPAR $\alpha$  リガンド活性（図5 g 参照）及び脂肪酸酸化（図5 h 参照）の増加がほとんど観察されなくなった。

#### （7）肝細胞内の結合及び作用に対するsiRNAの影響

肝細胞へのAdipoの結合を調べた。肝細胞は全長Adipoに対して特異的な結合を示した（図6 b 参照）。AdipoR1及びAdipoR2の発現によって、globular Adipo及び全長Adipoの肝細胞への結合が促進した（図6 a, b 参照）。逆に、肝細胞において、siRNAによりAdipoR2の発現を抑制すると、全長Adipoの結合が大きく減少した（図6 b 参照）。これらの結果から、AdipoR1は、globular Adipoに対して比較的选择性を有する受容体であり、AdipoR2は全長Adipoに対して比較的选择性を有する受容体であると考えられる。

正常ヒト大動脈内皮細胞（Normal Human Aortic Endothelial Cells : HAEC）へのAdipoの結合を調べた。AdipoR1及びAdipoR2の両者の発現をsiRNAにより同時に抑制すると、globular Adipoの結合は大幅に減少し（図6 e 参照）、全長Adipoの結合は一部減少した（図6 f 参照）。この結果は、AdipoR1及びAdipoRが、HAECにおいてもAdipoに対する受容体であることを示す。

## (8) スキャッチャードプロット解析

図 5 e 及び f に関する実験を再度より詳細に行って得られた結果を図 7 a 及び b に示す。図 7 a は図 5 e に対応する図であり、二本鎖 siRNA をトランスフェクトした C2C12 筋細胞への  $[^{125}\text{I}]$  globular Adipo の結合等温線 (binding isotherm) を示し、図 7 b は図 5 f に対応する図であり、二本鎖 siRNA をトランスフェクトした C2C12 筋細胞への  $[^{125}\text{I}]$  全長 Adipo の結合等温線 (binding isotherm) を示す。なお、図 7 a 及び b 中、□は無関係なコントロール siRNA、■はマウス AdipoR1 に対する siRNA、●はマウス AdipoR2 に対する siRNA、▲はマウス AdipoR1 及びマウス AdipoR2 に対する siRNA を用いた場合の結果を示す。

図 7 a 及び b に示す結果に基づきスキャッチャードプロット解析を行った結果をそれぞれ図 7 c 及び d に示す。

無関係な siRNA をトランスフェクトした C2C12 筋細胞は、全長 Adipo よりも globular Adipo に強く結合した (図 7 a 及び b 参照)。

スキャッチャードプロット解析によって、globular Adipo に対する 2 種類の結合部位、すなわち高アフィニティー結合部位 ( $K_d$  値: 約  $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $1.14\text{nM}$  gAd 三量体等量) と中アフィニティー結合部位 ( $K_d$  値: 約  $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $14.4\text{nM}$  gAd 三量体等量) が存在する一方 (図 7 c 参照)、全長 Adipo に対する 2 種類の結合部位、すなわち中アフィニティー結合部位 ( $K_d$  値: 約  $6.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $49.1\text{nM}$  Ad 六量体等量) と低アフィニティー結合部位 ( $K_d$  値: 約  $329.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $2415\text{nM}$  Ad 六量体等量) が存在することが明らかとなった (図 7 d 参照)。

siRNA により AdipoR1 の発現を抑制すると、globular Adipo の結合はかなり減少したが (図 7 a 参照)、全長 Adipo の結合はわずかに減少しただけだった (図 7 b 参照)。AdipoR1 の発現を特異的に抑制すると、globula

r Adipoに対する高アフィニティー結合部位の活性は失われるが、globular Adipoに対する中アフィニティー結合部位の活性は影響されないことが、スキッチャードプロット解析によって明らかとなった（図 7 c 参照）。さらに、AdipoR1の発現を特異的に抑制すると、全長Adipoに対する中アフィニティー結合部位の活性は部分的に減少するが、全長Adipoに対する低アフィニティー結合部位の活性は失われることが、スキッチャードプロット解析によって明らかとなった（図 7 d 参照）。

AdipoR1とは対照的に、siRNAによりAdipoR2の発現を抑制すると、全長Adipoの結合はかなり減少したが（図 7 b 参照）、globular Adipoの結合はわずかに減少した（図 7 a 参照）。AdipoR2の発現を特異的に抑制すると、globular Adipoに対する高アフィニティー結合部位の活性は部分的に減少するが、globular Adipoに対する中アフィニティー結合部位の活性が失われることが、スキッチャードプロット解析によって明らかとなった（図 7 c 参照）。さらに、AdipoR2の発現を特異的に抑制すると、全長Adipoに対する中アフィニティー結合部位の活性は失われるが、全長Adipoに対する低アフィニティー結合部位の活性は影響されないことが、スキッチャードプロット解析によって明らかとなった（図 7 d 参照）。

#### （9）AMPK、ACC、p38 MAPK及びMAPKのリン酸化及びリン酸化量

図 8 a のパネルは、AdipoR1をトランスフェクトした（図中「AdipoR1」と記載）又はしていない（図中「Mock」と記載）C2C12細胞を $0.1 \mu\text{g/mL}$  gAd又は $1 \mu\text{g/mL}$ とともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化AMPK抗体とを反応させた結果を示し、図 8 b のパネルは、当該細胞の溶解物と抗リン酸化ACC抗体とを反応させた結果を示し、図 8 c のパネルは、当該細胞の溶解物と抗リン酸化p38 MAPK抗体とを反応させた結果を示し、図 8 d のパネルは、当該細胞の溶解物と抗リン酸

化MAPK抗体とを反応させた結果を示す。図8 eのパネルは、AdipoR1をトランスフェクトした（図中「AdipoR1」と記載）又はしていない（図中「Mock」と記載）肝細胞を0.1  $\mu$ g/mL gAd又は1  $\mu$ g/mLとともに10分間インキュベートした後、当該細胞の溶解物と抗リン酸化AMPK抗体とを反応させた結果を示し、図8 fのパネルは、当該細胞の溶解物と抗リン酸化ACC抗体とを反応させた結果を示す。図8 a～fの各パネルの下側のグラフは、パネルの各位置におけるリン酸化量を示す。なお、図中、「pAMPK」はリン酸化AMPK、「pACC」はリン酸化ACC、「pp38 MAPK」はリン酸化p38 MAPK、「pp44MAPK」はリン酸化p44MAPK、「pp42 MAPK」はリン酸化p42 MAPKを表す。

AdipoR1をトランスフェクトしていないC2C12筋細胞において、globular Adipo及び全長Adipoの両者がAMPK、ACC及びp38 MAPKのリン酸化量を増加させたが、MAPK等の他のプロテインキナーゼのリン酸化量は増加させなかった（図8 a～d 参照）。C2C12細胞におけるAdipoR1の発現は、globular AdipoによるAMPK、ACC及びp38 MAPKのリン酸化の亢進に関連していた（図8 a～d 参照）。このことは、AdipoR1がglobular AdipoによるAMPK及びp38 MAPK活性化を媒介することを示唆する。

AdipoR1をトランスフェクトしていない肝細胞において、全長AdipoはAMPK活性化及びACCリン酸化を亢進させたが、globular Adipoは亢進させなかった（図8 e 及び f 参照）。肝細胞におけるAdipoR1の発現は、globular Adipo及び全長AdipoによるAMPK及びACCリン酸化の亢進に関連していた（図8 e 及び f 参照）。このことは、AdipoR1がglobular Adipo及び全長AdipoによるAMPK及びACCリン酸化を媒介することができることを示唆する。

AdipoR1をトランスフェクトしていない（図8 中「Mock」と記載）C2C12筋細胞において、globular Adipoにより亢進される脂肪酸酸化及びグ

ルコース取り込みは、優性阻害型 (dominant negative : DN) AMPK又はp38 MAPK特異的阻害剤 SB203580(Barger, P.M. ら, J. Biol. Chem. 276, 44495-44501 (2001); Puigserver, P. ら, Mol. Cell 8, 971-982 (2001); Michael, L.F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 3820-3825 (2001)) によって部分的に阻害された(図 8 g 及び h 参照)。C2C12筋細胞におけるAdipoR1の発現(図 8 中「mAdipoR1」と記載)は、globular Adipoによる脂肪酸酸化及びグルコース取り込みを亢進させたが、これもDN-AMPK又はSB203580によって部分的に阻害された(図 8 g 及び h 参照)。したがって、AdipoR1を介したglobular Adipoによる脂肪酸酸化及びグルコース取り込みの亢進は、C2C12筋細胞におけるAMPK及びp38 MAPKの両者の経路に関連していると考えられた。

以上の結果は、本実施例で取得されたAdipoR1 cDNA (配列番号 1, 5) 及びAdipoR2 cDNA (配列番号 3, 7) が、それぞれ生物学的機能を有するAdipoR1 (配列番号 2, 6) 及びAdipoR2 (配列番号 4, 8) をコードすることを示す。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、アディポネクチン結合能を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及び上記タンパク質に対する抗体が提供される。また、本発明によって、上記タンパク質、遺伝子、組換えベクター又は形質転換体を利用した、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法及びスクリーニング用キットが提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 又は (b) に示すタンパク質。

(a) 配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2、4、6 又は 8 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアディポネクチン結合能を有するタンパク質

2. 請求項 1 記載のタンパク質をコードする遺伝子。

3. 以下の (c) 又は (d) に示す DNA を含む請求項 2 記載の遺伝子。

(c) 配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA

(d) 配列番号 1、3、5 又は 7 に記載の塩基配列からなる DNA と相補的な DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつアディポネクチン結合能を有するタンパク質をコードする DNA

4. 請求項 2 又は 3 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

5. 請求項 4 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

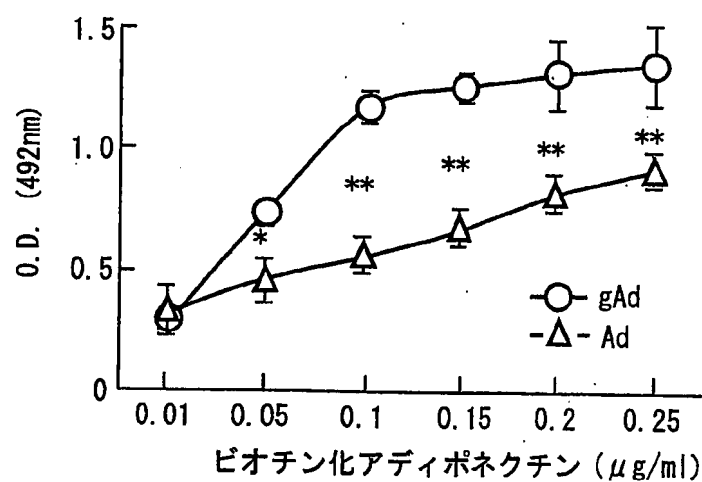
6. 請求項 1 記載のタンパク質に反応し得る抗体又はその断片。

7. 試験物質と請求項 1 記載のタンパク質とを接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

8. 請求項 1 記載のタンパク質、請求項 2 若しくは 3 記載の遺伝子、請求項 4 記載の組換えベクター又は請求項 5 記載の形質転換体を含む、アディポネクチン受容体に対するリガンド、アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング用キット。

図 1

(a)



(b)

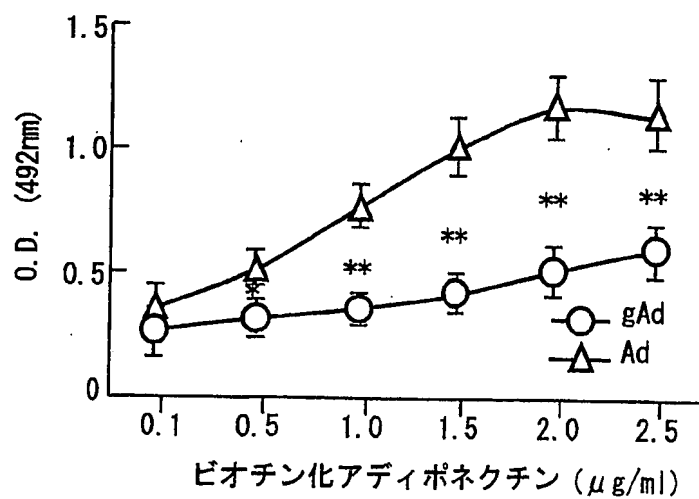




図 1

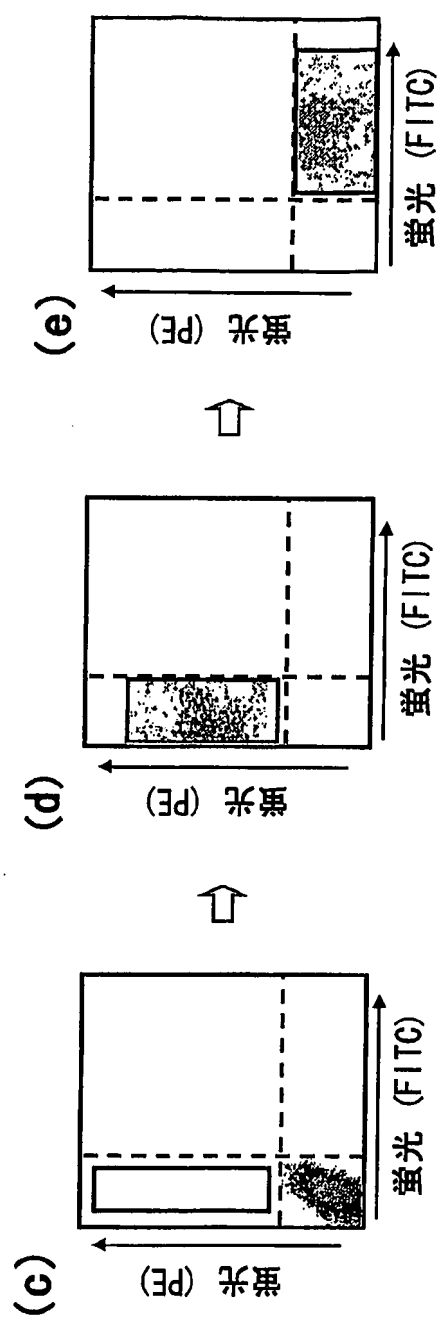


図 1

(f)

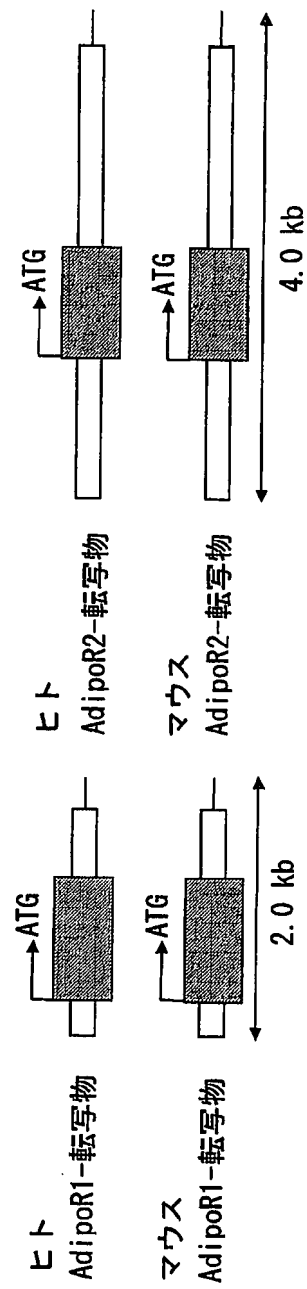


図 1

(g)

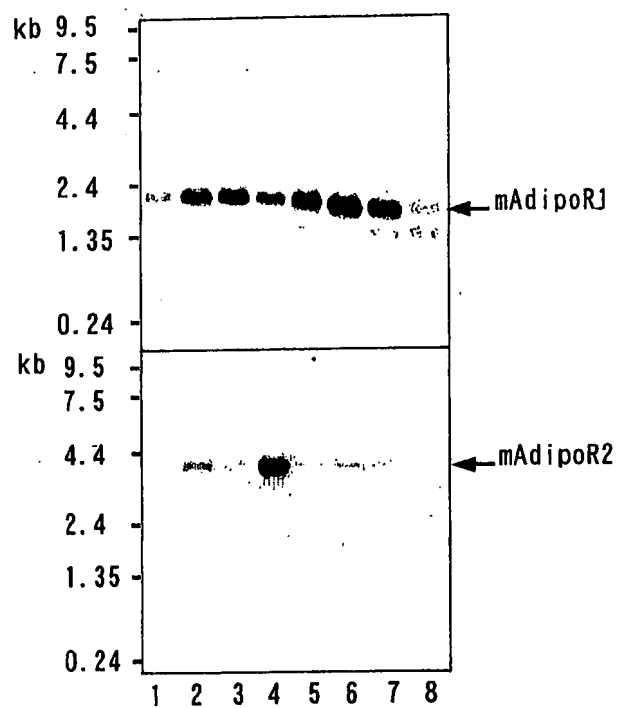


図 1

(h)

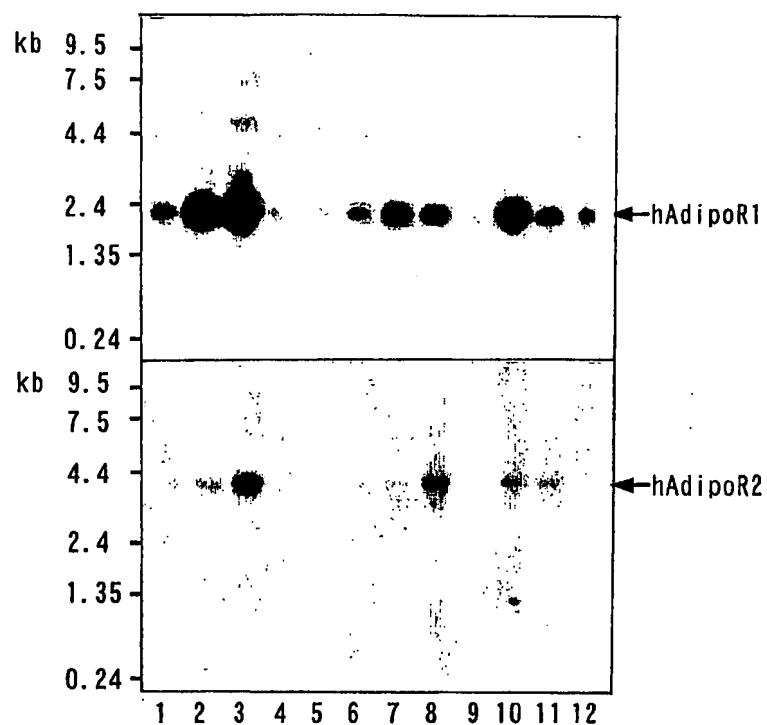


図 2

(a)

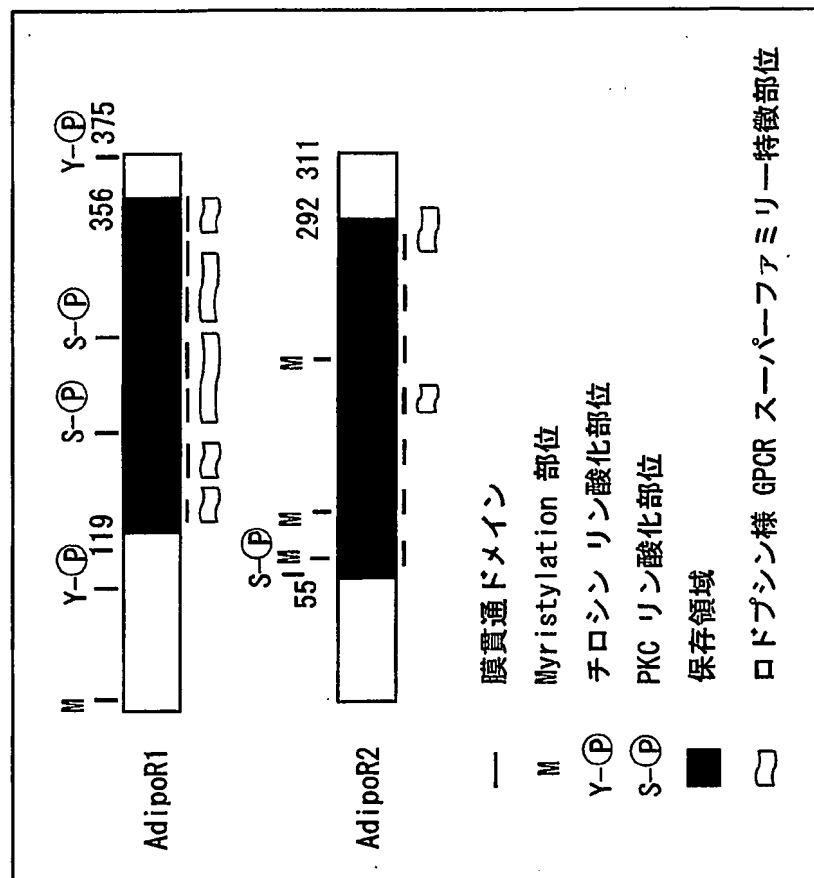


図 2

(b)

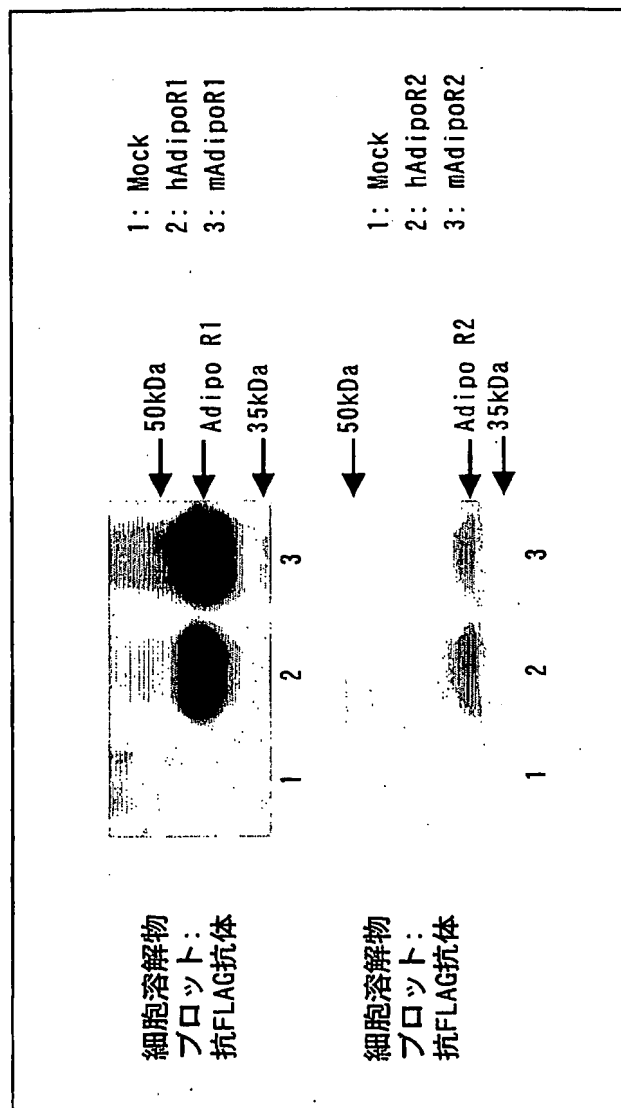


図 2

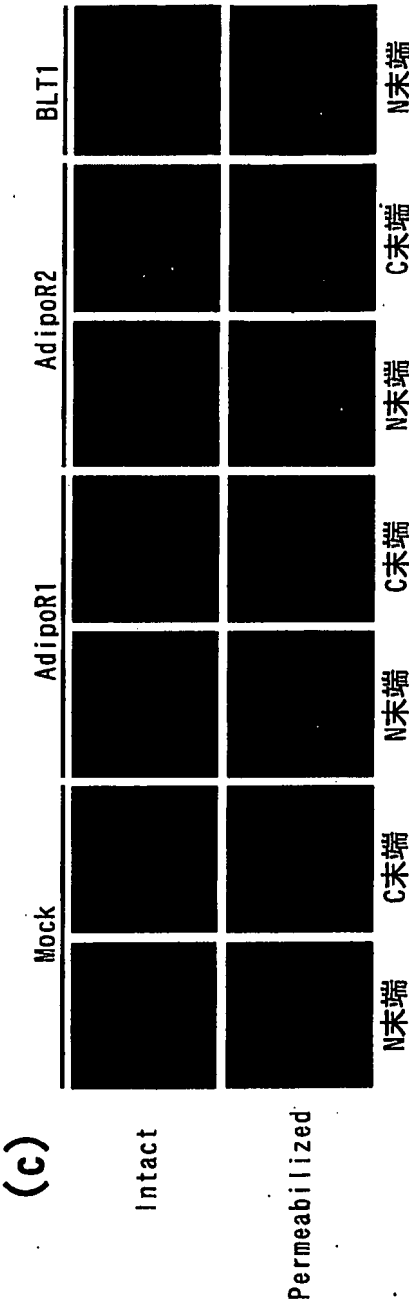


図 2

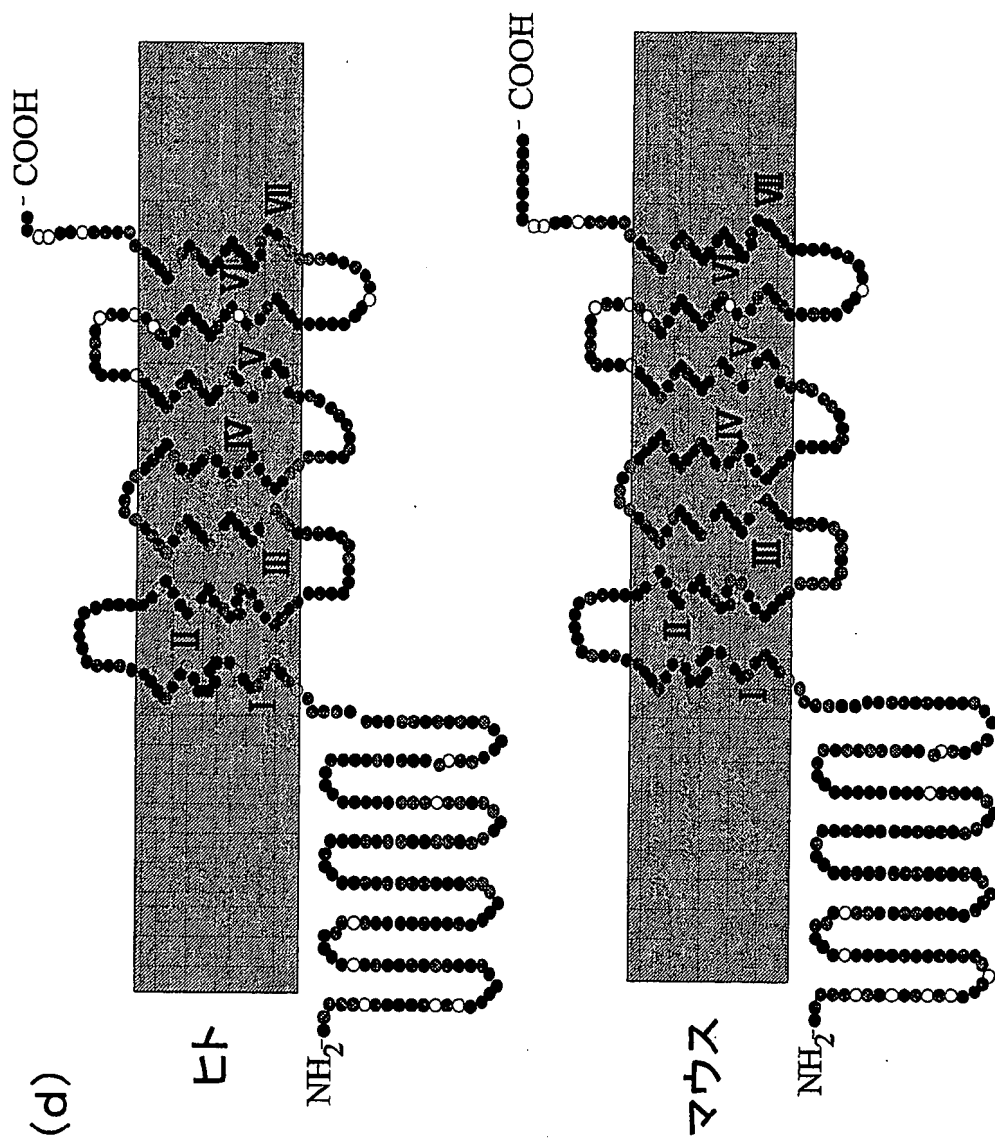




図 2

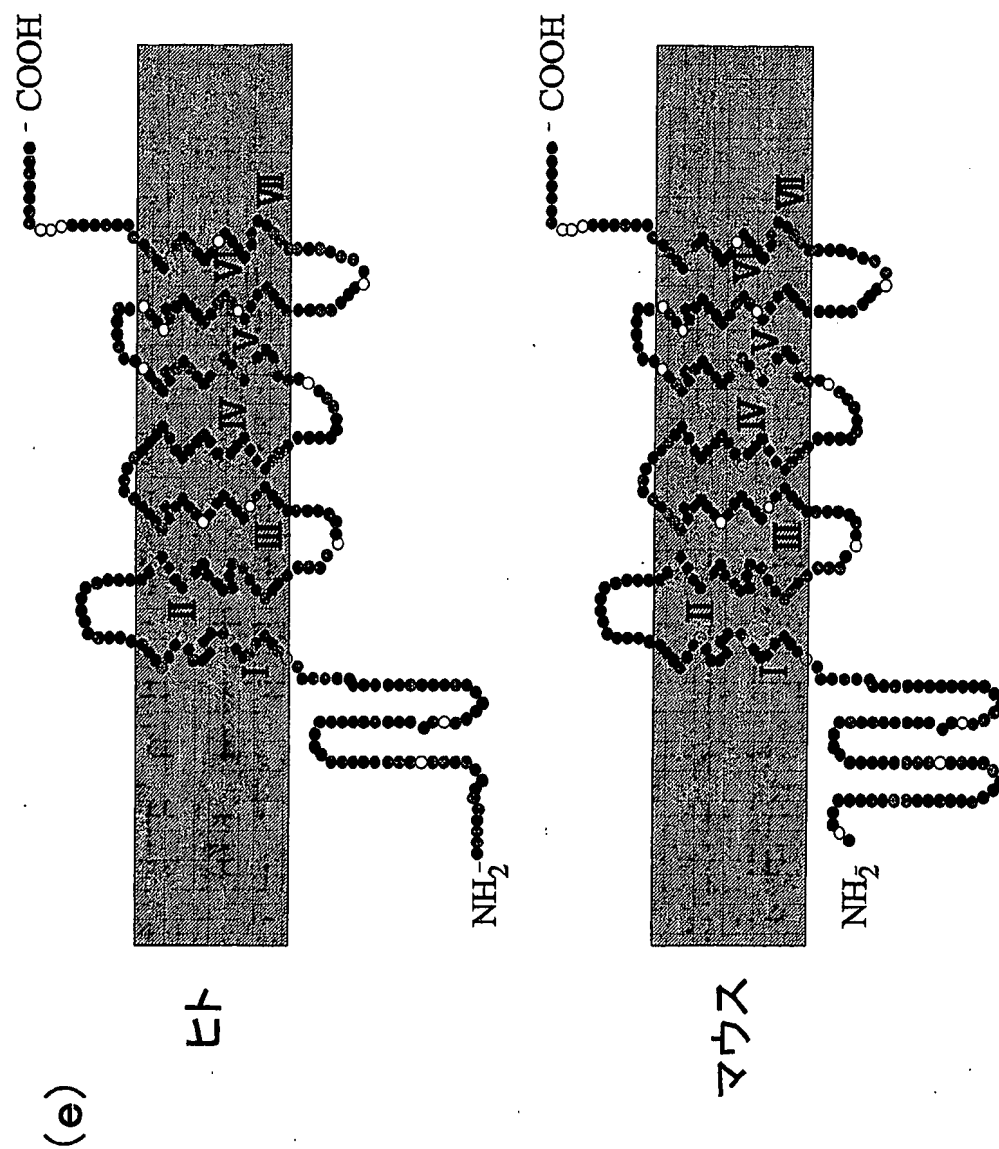
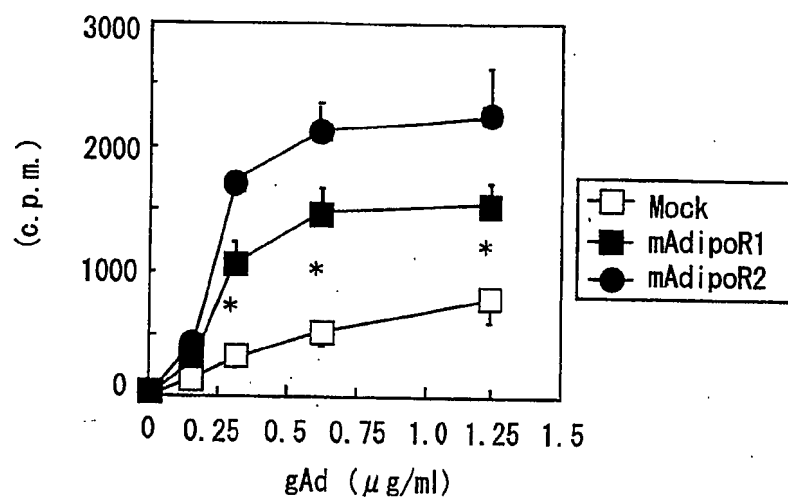


図 3

(a)



(b)

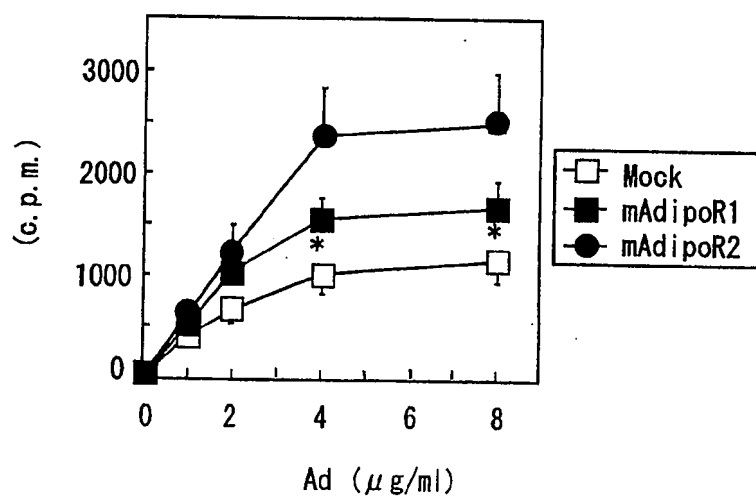


図 3

(c)

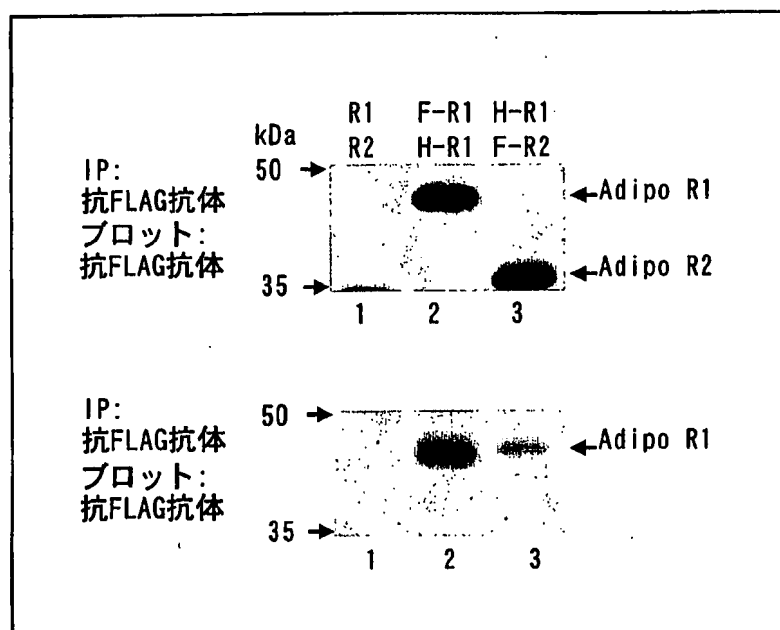
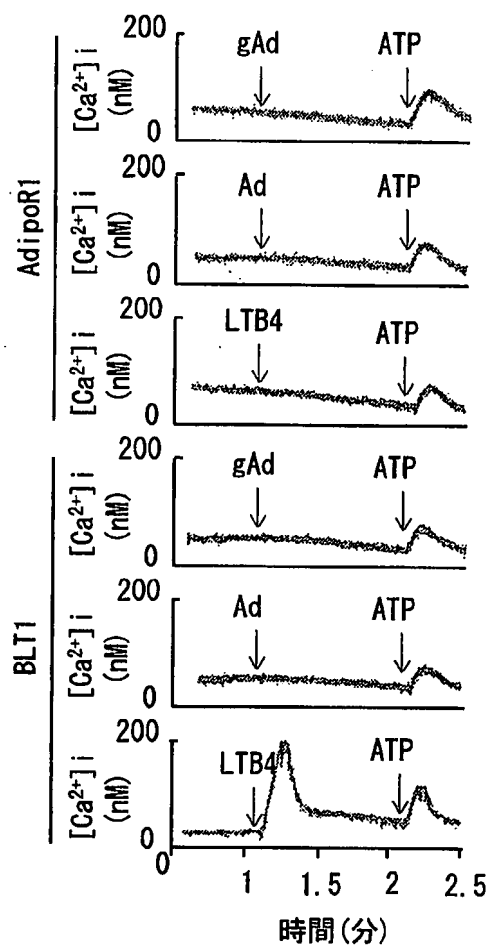


図 3

(d)



(e)



図 3

(f)

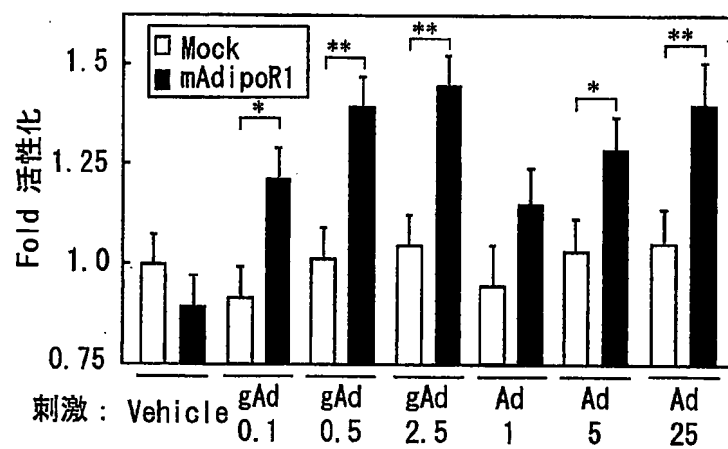
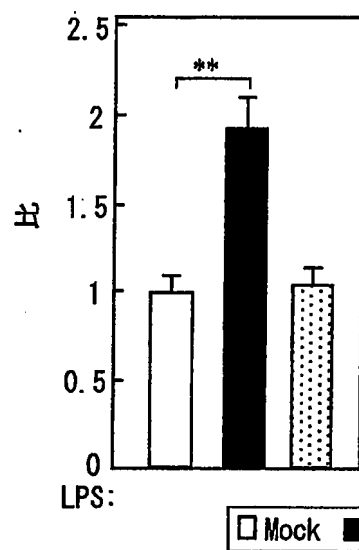


図 4

(a)



(b)

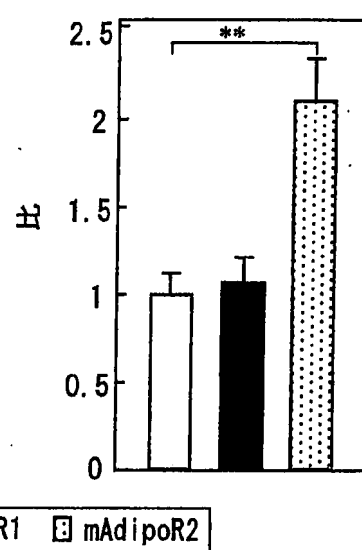
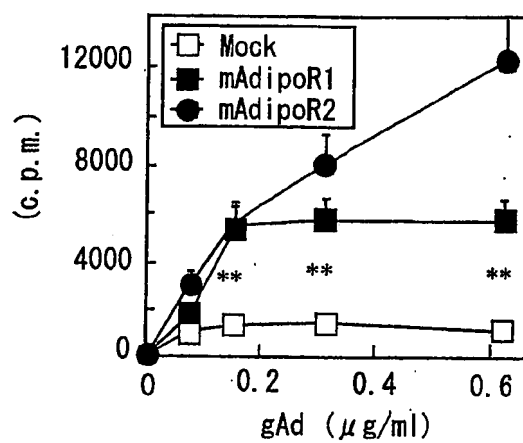


図 4

(c)



(d)

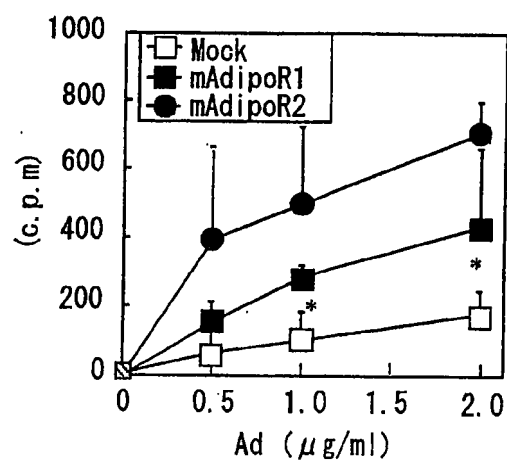




図 4

(e)

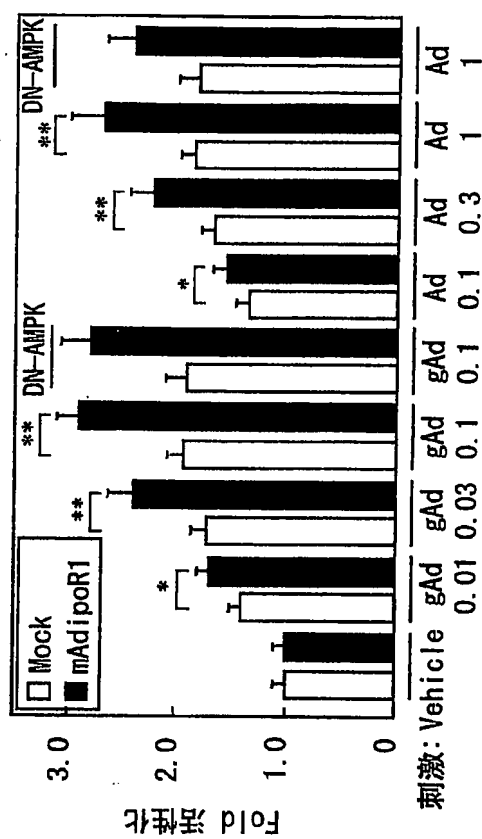


図 4

(f)

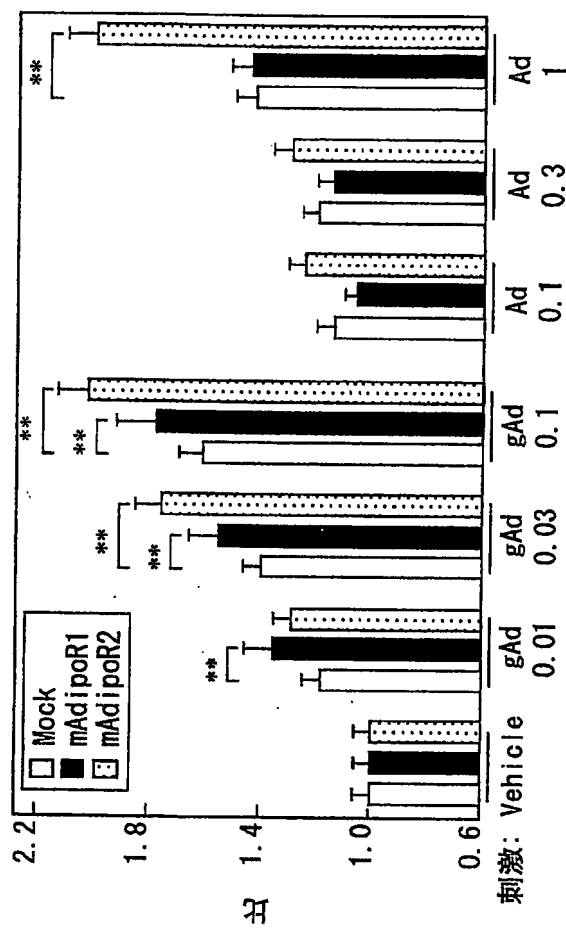
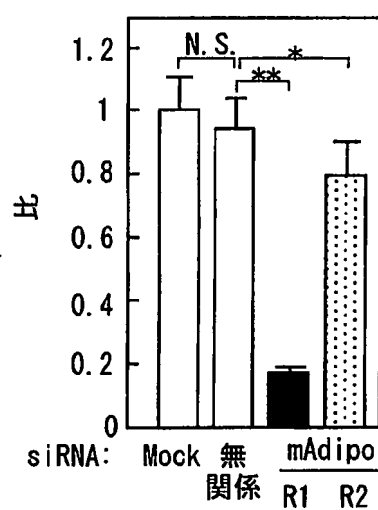


図 5

(a)



(b)

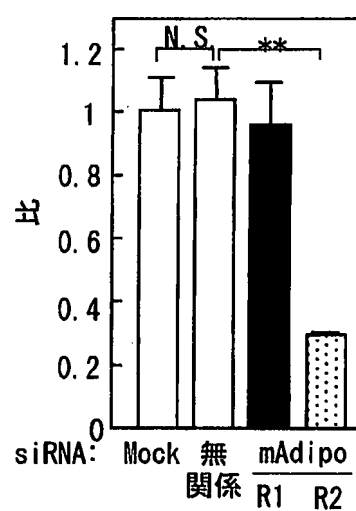
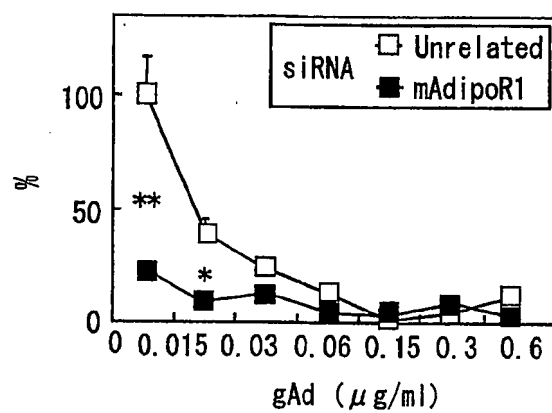


図 5

(c)



(d)

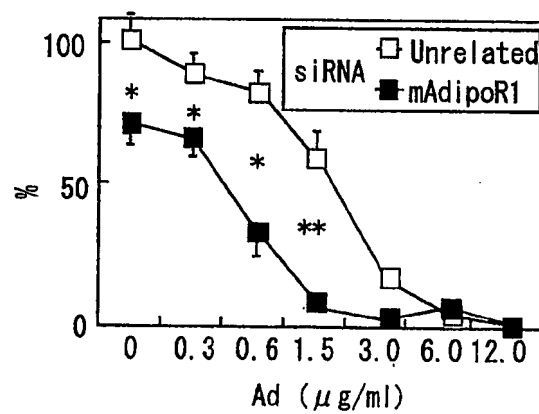


図 5

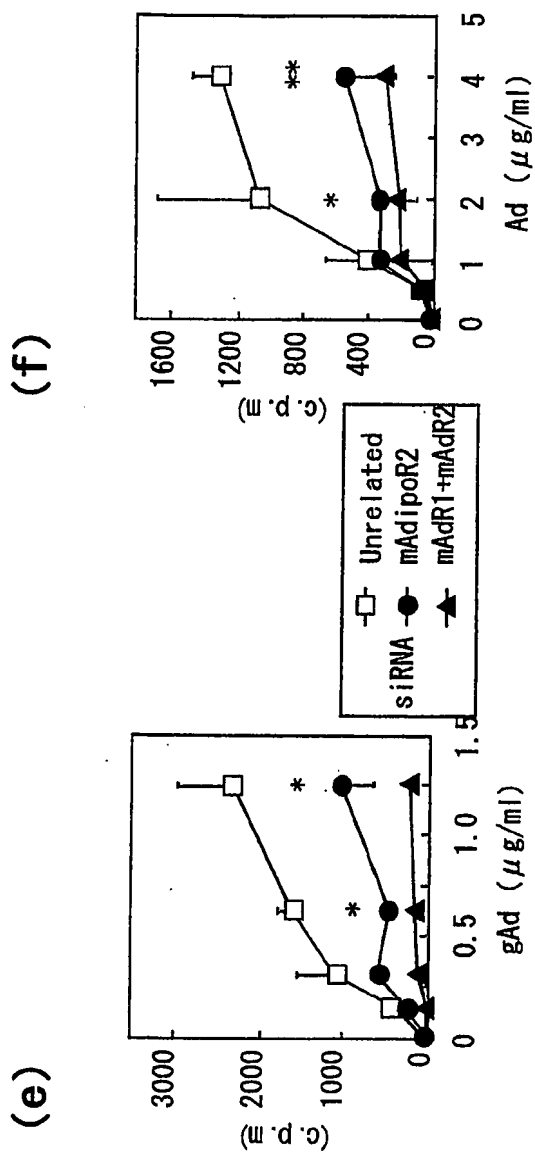


図 5

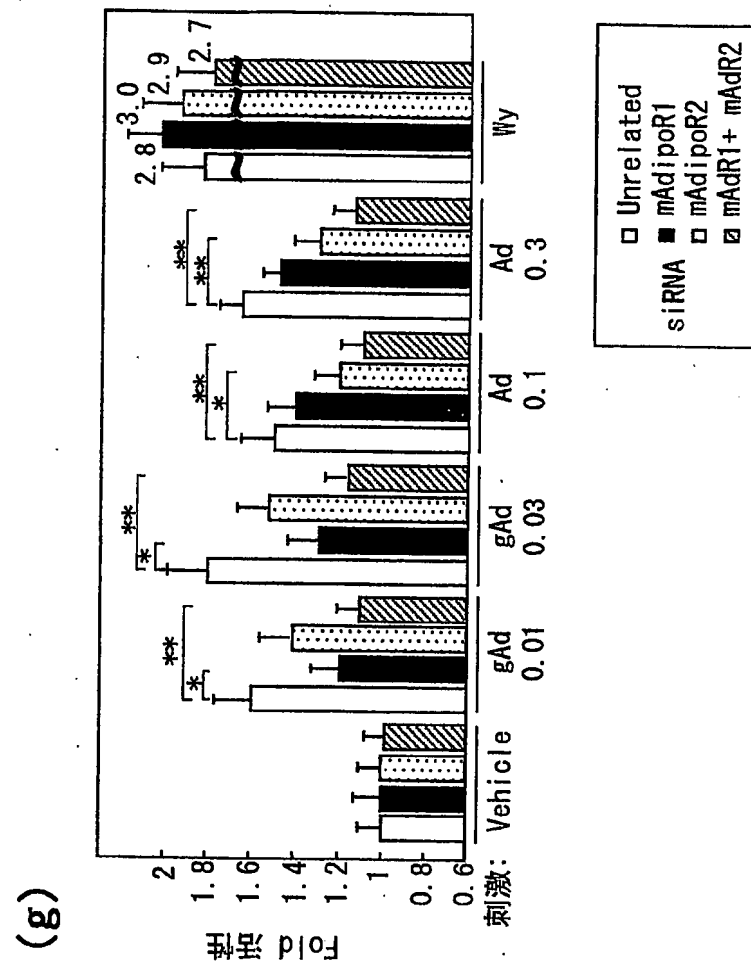


図 5

(h)

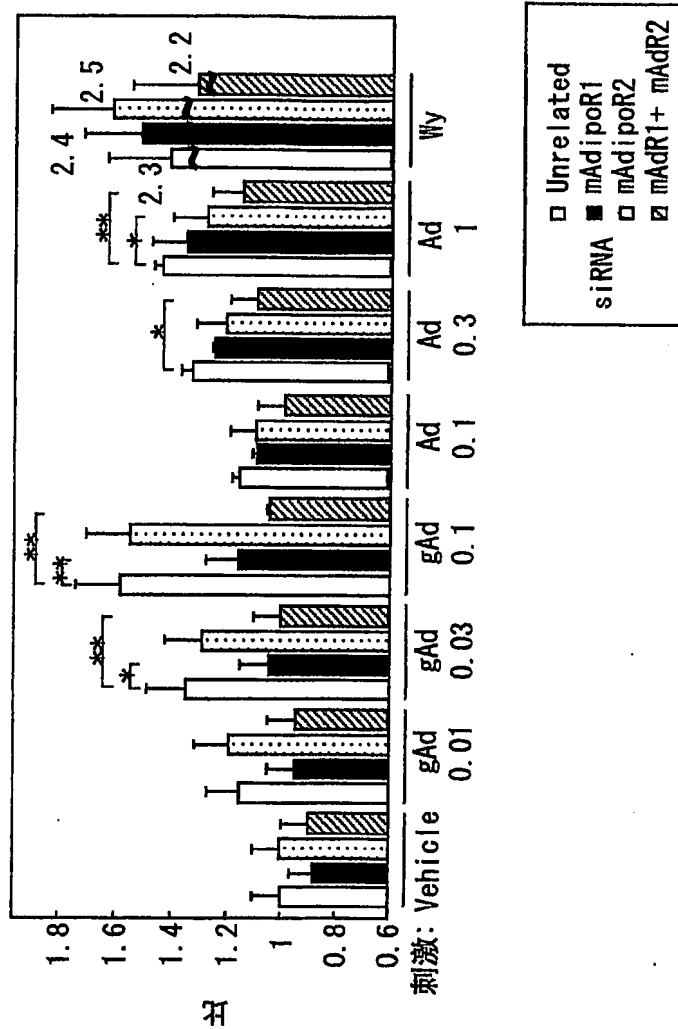


図 5

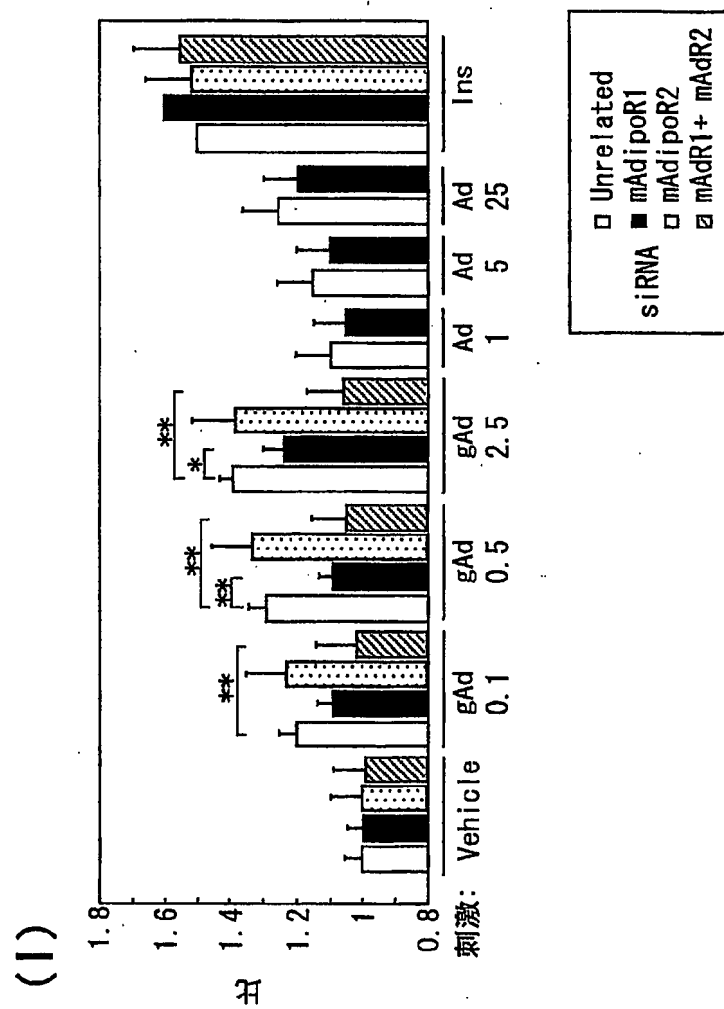




図 6

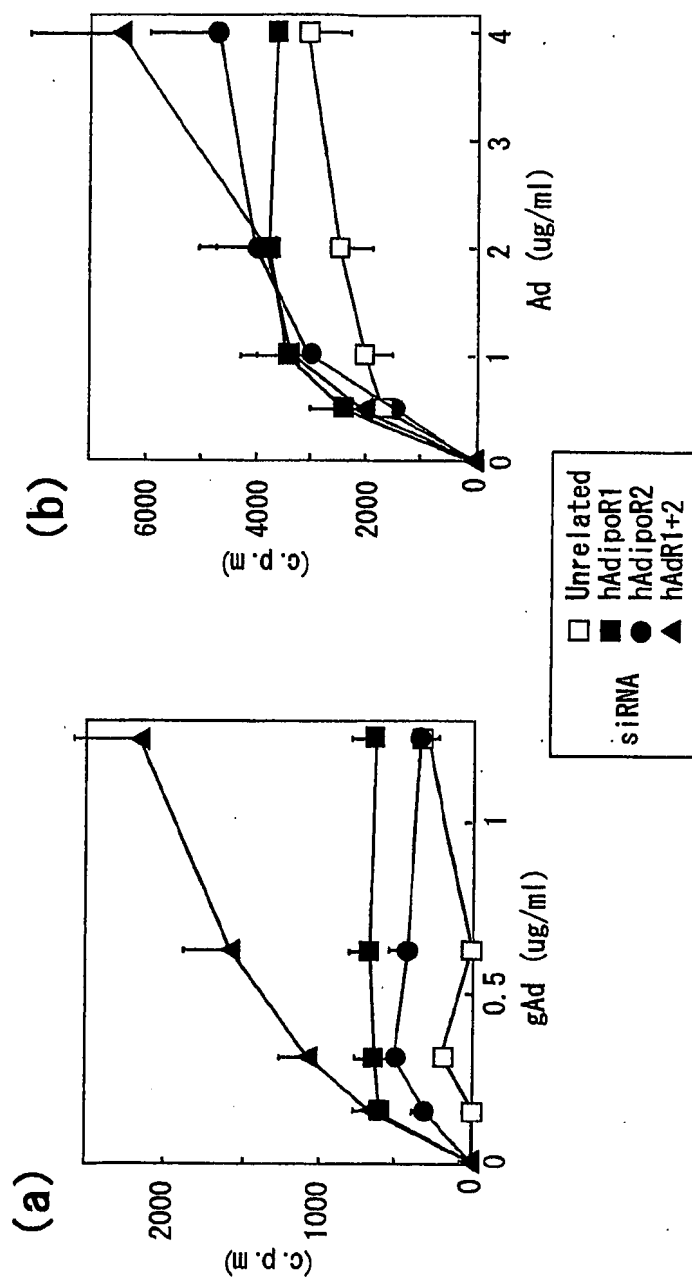


図 6

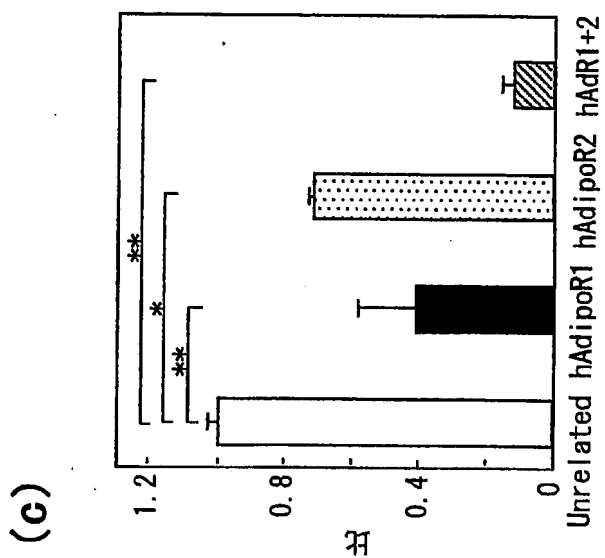
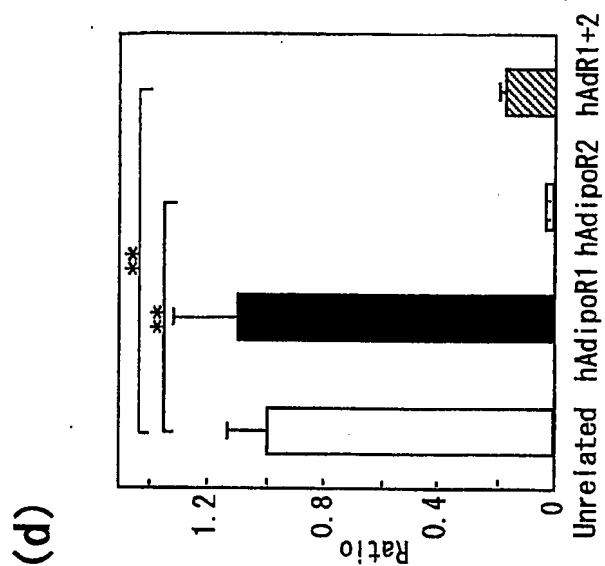


図 6

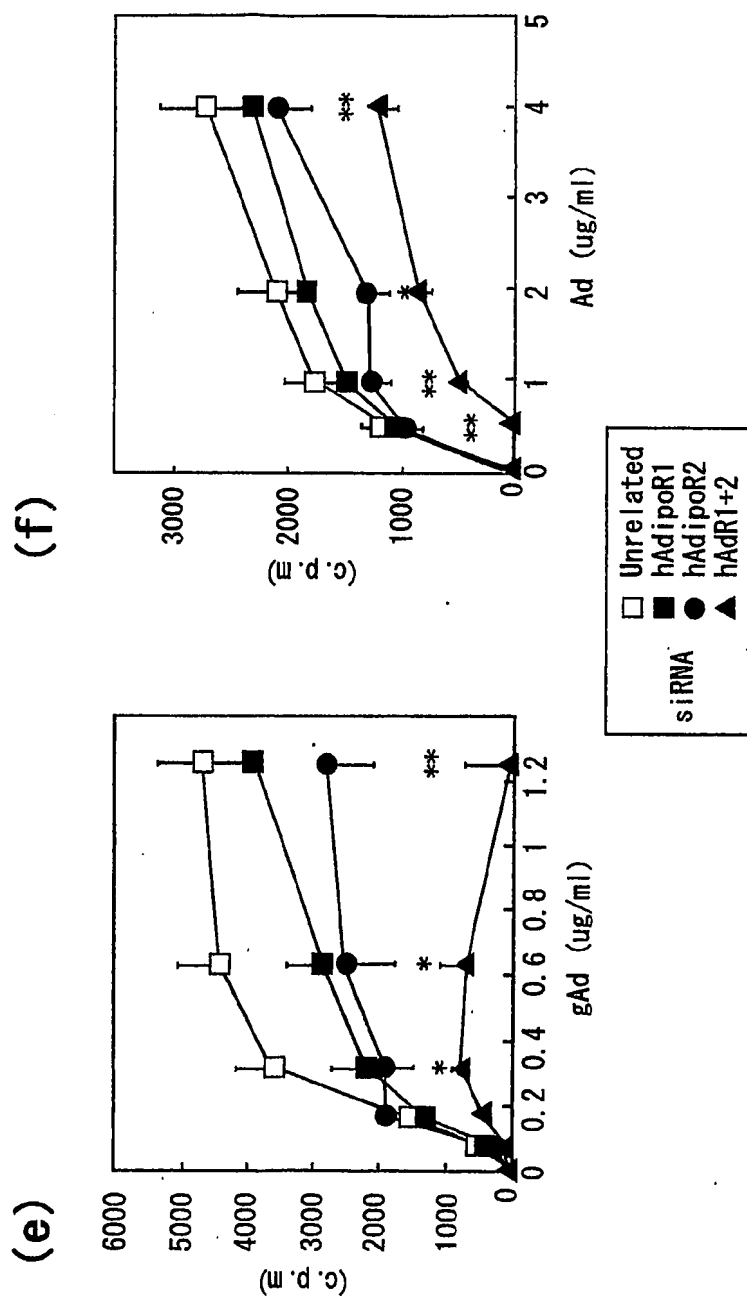
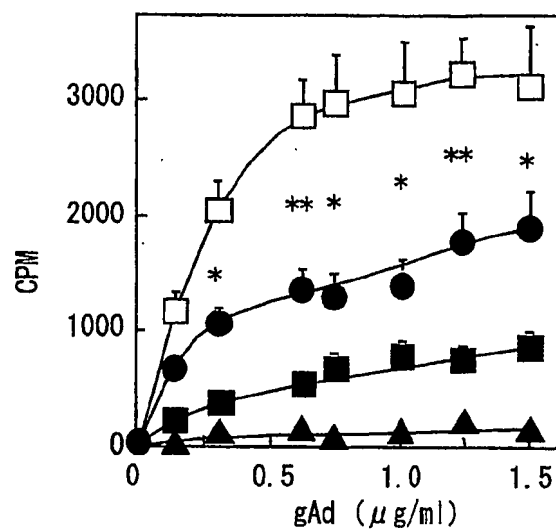


図 7

(a)



(b)

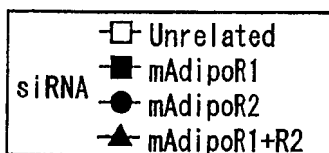
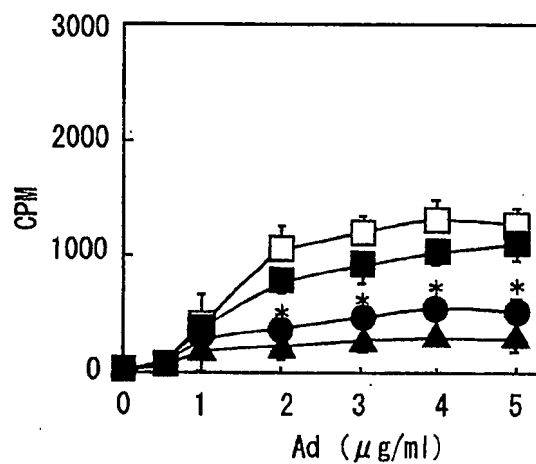


図 7

(c)

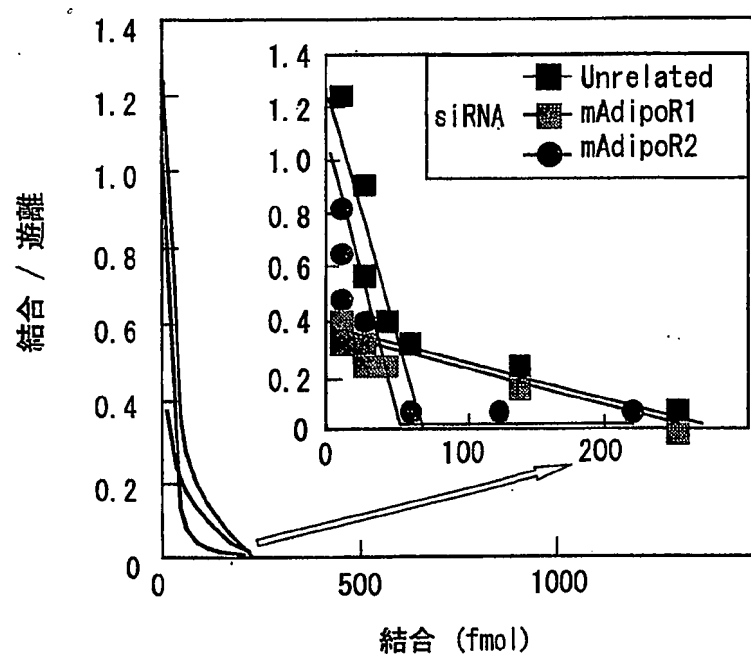
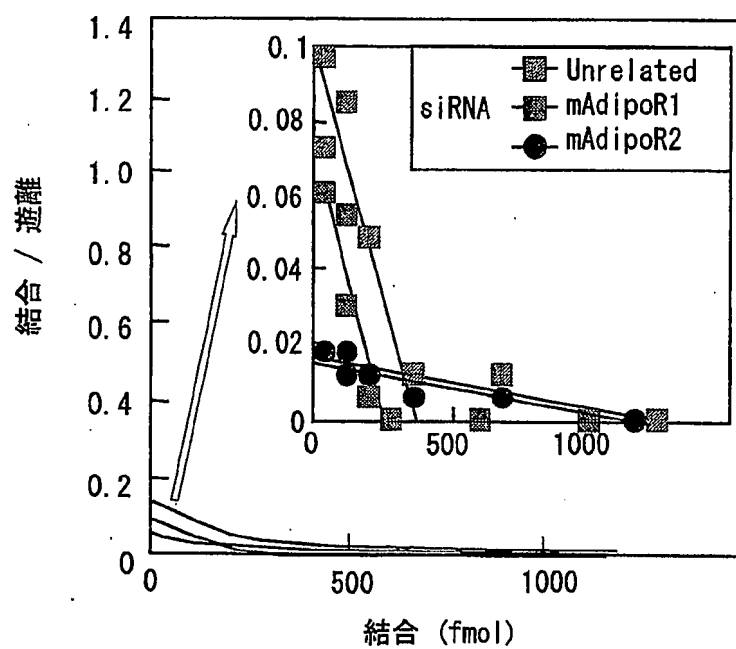


図 7

(d)



 8

(a)

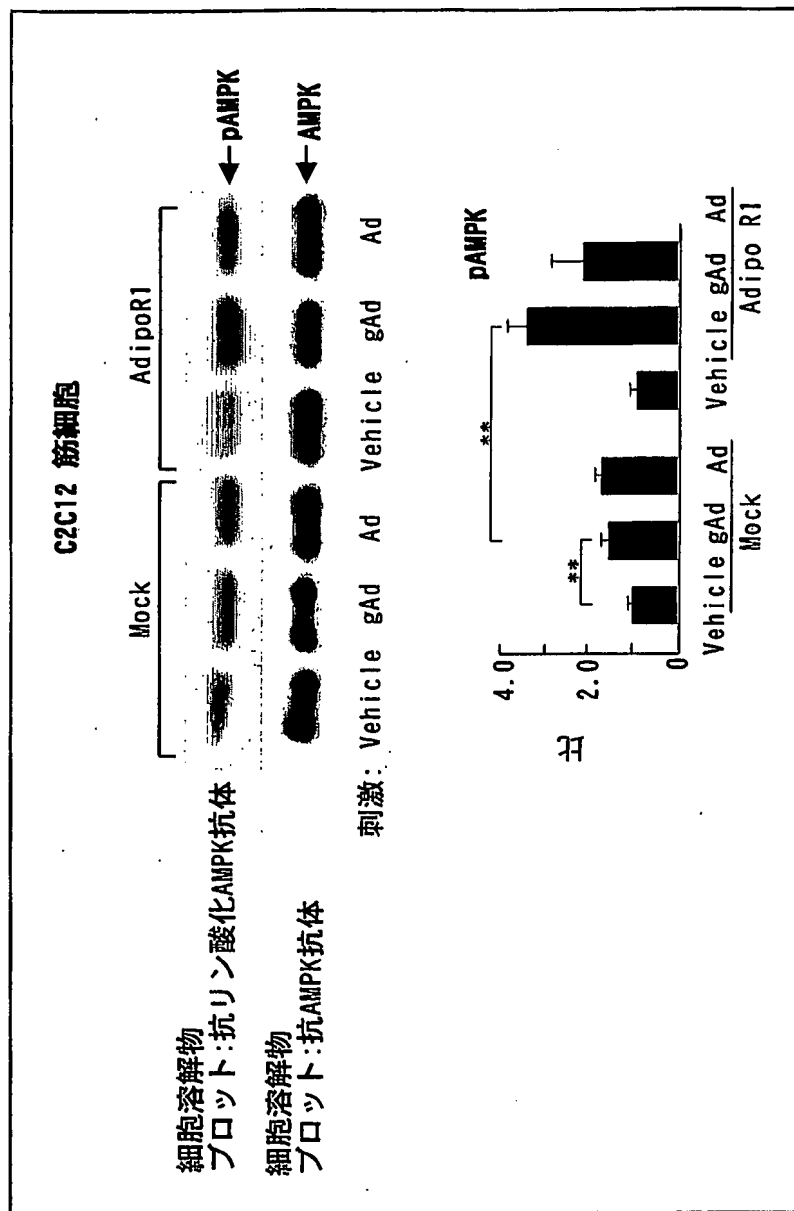


図 8

(b)

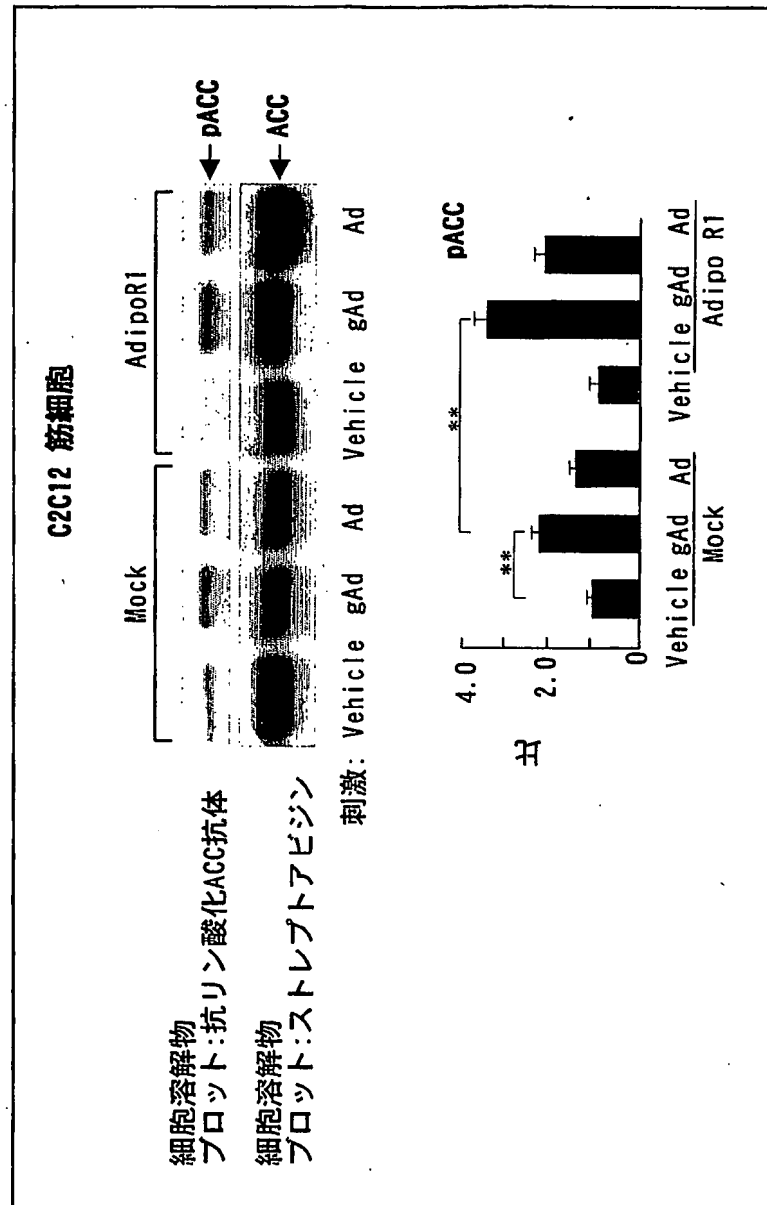




図 8

(c)

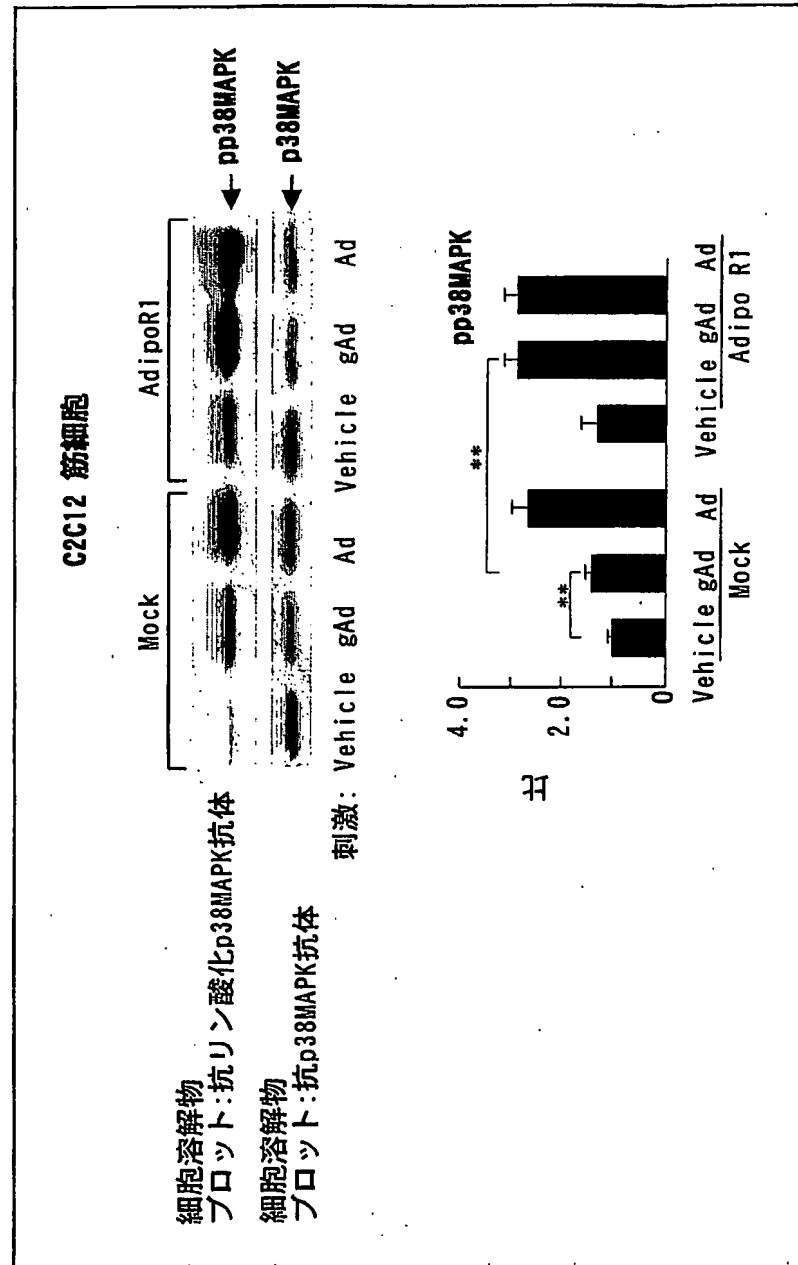


図 8

(d)

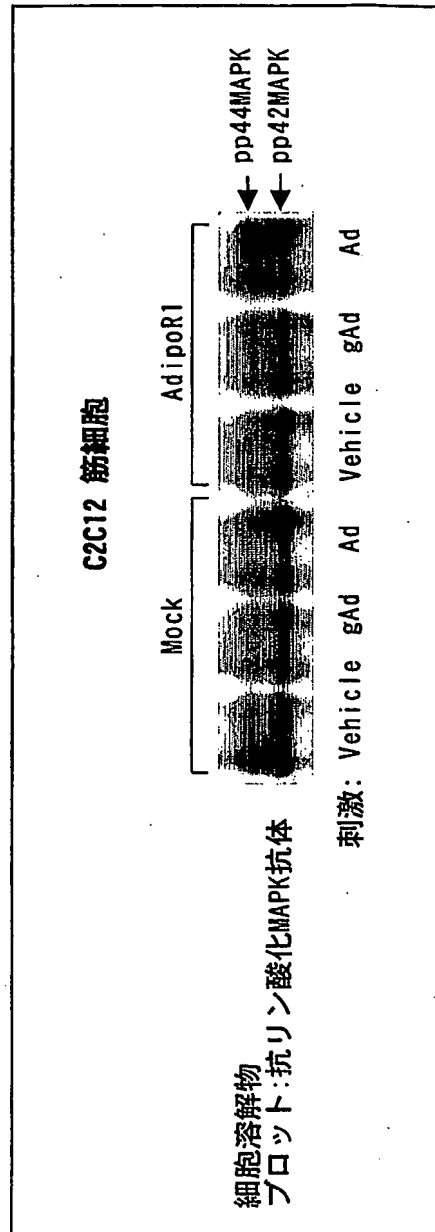
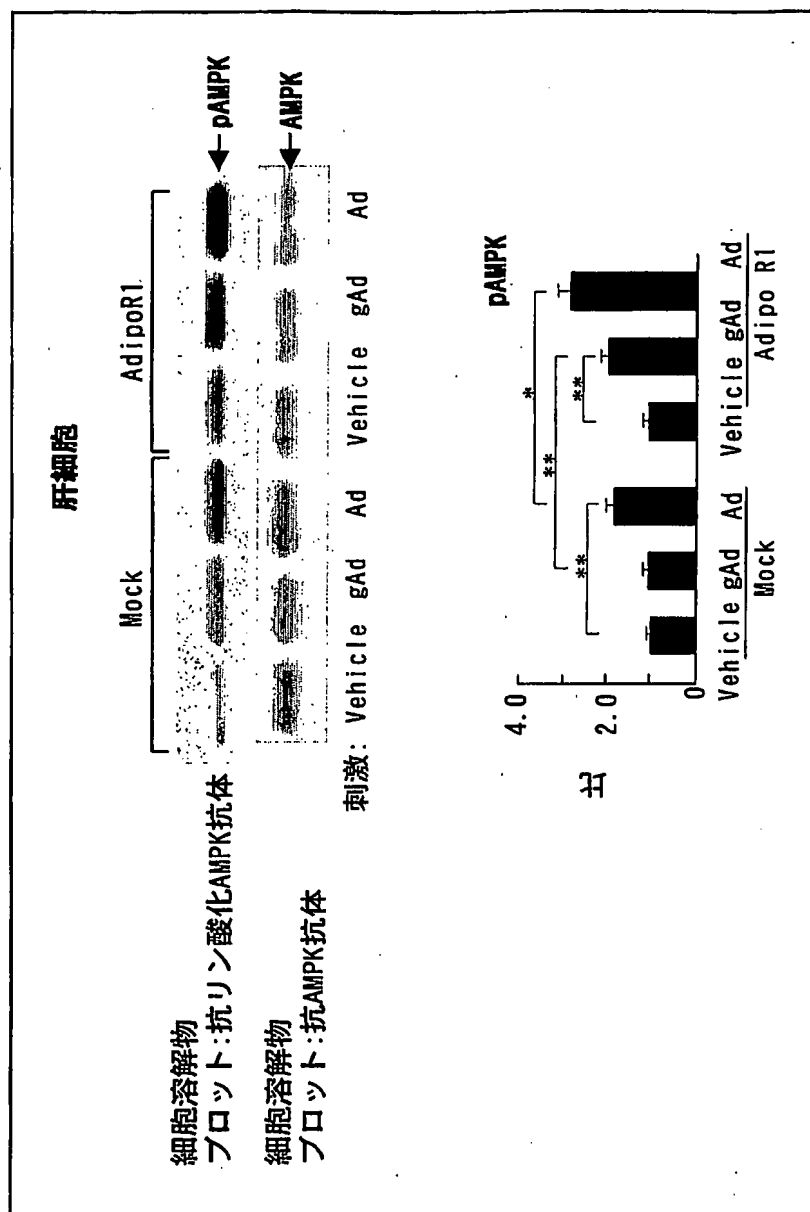


図 8

(e)



8

(f)

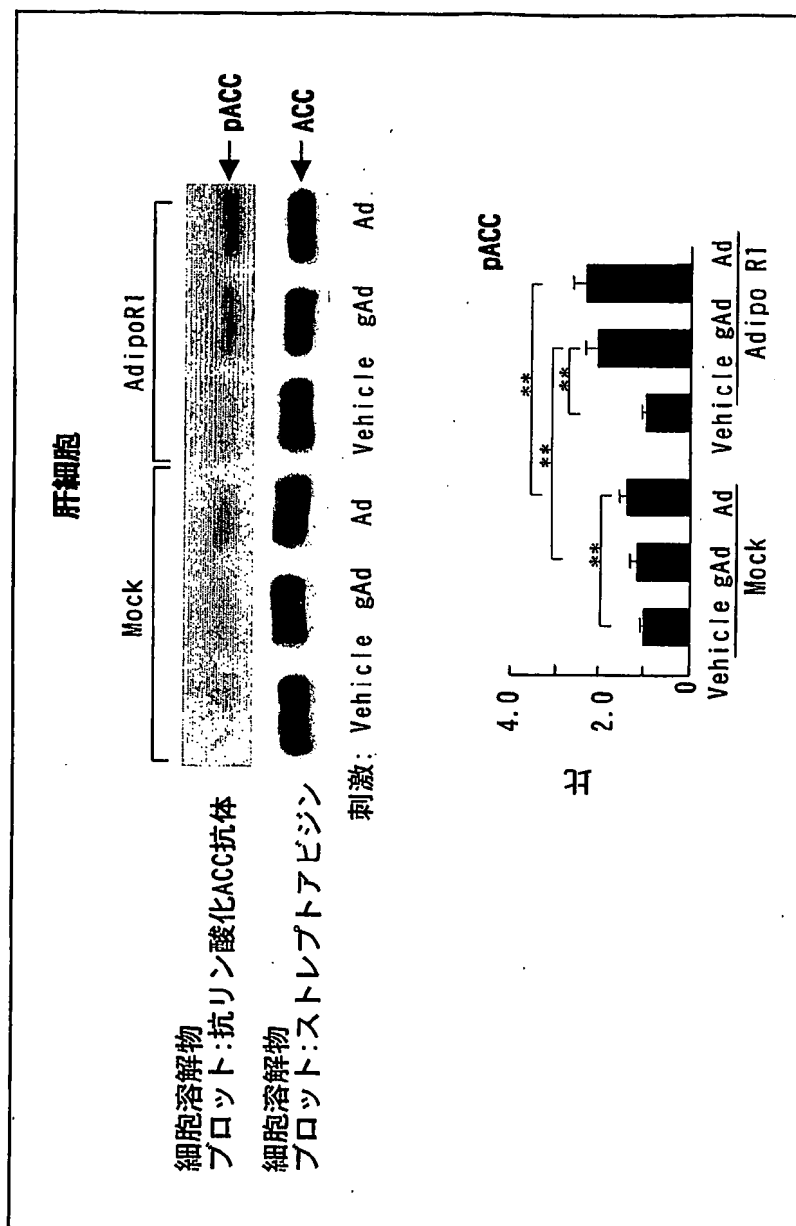


図 8

(g)

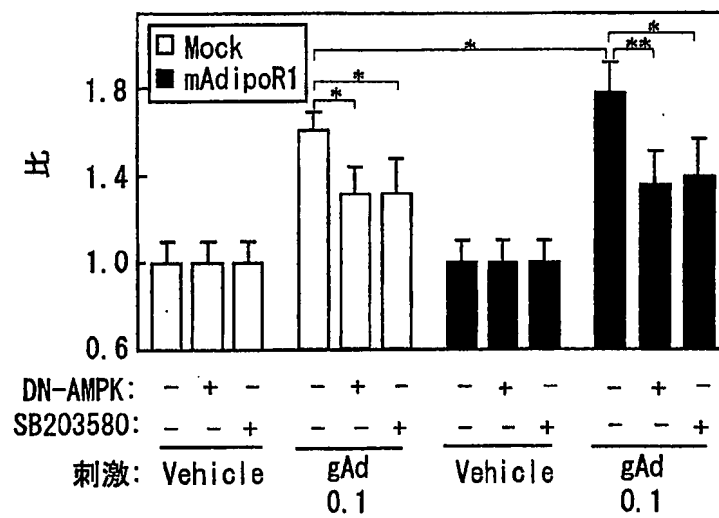
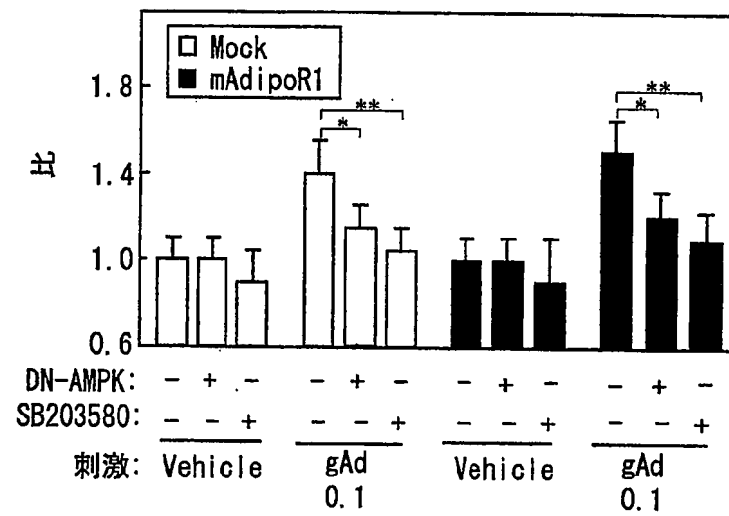


図 8

(h)



## SEQUENCE LISTING

<110> Nissan Chemical Industries, Ltd. .

Center for Advanced Science and Technology Incubation, Ltd.

<120> Adiponectin receptors and genes coding the same

<160> 8

<210> 1

<211> 1128

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1125)

<400> 1

atg tct tcc cac aaa gga tct gtg gtg gca cag ggg aat ggg gct cct 48

Met Ser Ser His Lys Gly Ser Val Val Ala Gln Gly Asn Gly Ala Pro

1 5 10 15

gcc agt aac agg gaa gct gac acg gtg gaa ctg gct gaa ctg gga ccc 96

Ala Ser Asn Arg Glu Ala Asp Thr Val Glu Leu Ala Glu Leu Gly Pro

20 25 30

ctg cta gaa gag aag ggc aaa cgg gta atc gcc aac cca ccc aaa gct 144

Leu Leu Glu Glu Lys Gly Lys Arg Val Ile Ala Asn Pro Pro Lys Ala

35	40	45	
gaa gaa gag caa aca tgc cca gtg ccc cag gaa gaa gag gag gag gtg			192
Glu Glu Glu Gln Thr Cys Pro Val Pro Gln Glu Glu Glu Glu Glu Val			
50	55	60	
cgg gta ctg aca ctt ccc ctg caa gcc cac cac gcc atg gag aag atg			240
Arg Val Leu Thr Leu Pro Leu Gln Ala His His Ala Met Glu Lys Met			
65	70	75	80
gaa gag ttt gtg tac aag gtc tgg gag gga cgt tgg agg gtc atc cca			288
Glu Glu Phe Val Tyr Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp Arg Val Ile Pro			
85	90	95	
tat gat gtg ctc cct gac tgg cta aag gac aac gac tat ctg cta cat			336
Tyr Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp Tyr Leu Leu His			
100	105	110	
ggt cat aga cct ccc atg ccc tcc ttt cgg gct tgc ttc aag agc atc			384
Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys Phe Lys Ser Ile			
115	120	125	
ttc cgc att cat aca gaa act ggc aac atc tgg acc cat ctg ctt ggt			432
Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr His Leu Leu Gly			
130	135	140	
ttc gtg ctg ttt ctc ttt ttg gga atc ttg acc atg ctc aga cca aat			480
Phe Val Leu Phe Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Leu Arg Pro Asn			
145	150	155	160



atg tac ttc atg gcc cct cta cag gag aag gtg gtt ttt ggg atg ttc 528  
Met Tyr Phe Met Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val Phe Gly Met Phe

165

170

175

ttt ttg ggt gca gtg ctc tgc ctc agc ttc tcc tgg ctc ttt cac acc 576  
Phe Leu Gly Ala Val Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp Leu Phe His Thr

180

185

190

gtc tat tgt cat tca gag aaa gtc tct cgg act ttt tcc aaa ctg gac 624  
Val Tyr Cys His Ser Glu Lys Val Ser Arg Thr Phe Ser Lys Leu Asp

195

200

205

tat tca ggg att gct ctt cta att atg ggg agc ttt gtc ccc tgg ctc 672  
Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe Val Pro Trp Leu

210

215

220

tat tat tcc ttc tac tgc tcc cca cag cca cgg ctc atc tac ctc tcc 720  
Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Ser Pro Gln Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Ser

225

230

235

240

atc gtc tgt gtc ctg ggc att tct gcc atc att gtg gcg cag tgg gac 768  
Ile Val Cys Val Leu Gly Ile Ser Ala Ile Ile Val Ala Gln Trp Asp

245

250

255

cgg ttt gcc act cct aag cac cgg cag aca aga gca ggc gtg ttc ctg 816  
Arg Phe Ala Thr Pro Lys His Arg Gln Thr Arg Ala Gly Val Phe Leu

260

265

270

gga ctt ggc ttg agt ggc gtc gtg ccc acc atg cac ttt act atc gct 864  
 Gly Leu Gly Leu Ser Gly Val Val Pro Thr Met His Phe Thr Ile Ala

275

280

285

gag ggc ttt gtc aag gcc acc aca gtg ggc cag atg ggc tgg ttc ttc 912  
 Glu Gly Phe Val Lys Ala Thr Thr Val Gly Gln Met Gly Trp Phe Phe

290

295

300

ctc atg gct gtg atg tac atc act gga gct ggc ctt tat gct gct cga 960  
 Leu Met Ala Val Met Tyr Ile Thr Gly Ala Gly Leu Tyr Ala Ala Arg

305

310

315

320

att cct gag cgc ttc ttt cct gga aaa ttt gac ata tgg ttc cag tct 1008  
 Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Phe Asp Ile Trp Phe Gln Ser

325

330

335

cat cag att ttc cat gtc ctg gtg gtg gca gca gcc ttt gtc cac ttc 1056  
 His Gln Ile Phe His Val Leu Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe

340

345

350

tat gga gtc tcc aac ctt cag gaa ttc cgt tac ggc cta gaa ggc ggc 1104  
 Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly

355

360

365

tgt act gat gac acc ctt ctc tga 1128  
 Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu

370

375

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ser Ser His Lys Gly Ser Val Val Ala Gln Gly Asn Gly Ala Pro

1 5 10 15

Ala Ser Asn Arg Glu Ala Asp Thr Val Glu Leu Ala Glu Leu Gly Pro

20 25 30

Leu Leu Glu Glu Lys Gly Lys Arg Val Ile Ala Asn Pro Pro Lys Ala

35 40 45

Glu Glu Glu Gln Thr Cys Pro Val Pro Gln Glu Glu Glu Glu Val

50 55 60

Arg Val Leu Thr Leu Pro Leu Gln Ala His His Ala Met Glu Lys Met

65 70 75 80

Glu Glu Phe Val Tyr Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp Arg Val Ile Pro

85 90 95

Tyr Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp Tyr Leu Leu His

100 105 110

Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys Phe Lys Ser Ile

115 120 125

Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr His Leu Leu Gly

130

135

140

Phe Val Leu Phe Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Leu Arg Pro Asn

145

150

155

160

Met Tyr Phe Met Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val Phe Gly Met Phe

165

170

175

Phe Leu Gly Ala Val Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp Leu Phe His Thr

180

185

190

Val Tyr Cys His Ser Glu Lys Val Ser Arg Thr Phe Ser Lys Leu Asp

195

200

205

Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe Val Pro Trp Leu

210

215

220

Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Ser Pro Gln Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Ser

225

230

235

240

Ile Val Cys Val Leu Gly Ile Ser Ala Ile Ile Val Ala Gln Trp Asp

245

250

255

Arg Phe Ala Thr Pro Lys His Arg Gln Thr Arg Ala Gly Val Phe Leu

260

265

270

Gly Leu Gly Leu Ser Gly Val Val Pro Thr Met His Phe Thr Ile Ala

275	280	285
Glu Gly Phe Val Lys Ala Thr Thr Val Gly Gln Met Gly Trp Phe Phe		
290	295	300
Leu Met Ala Val Met Tyr Ile Thr Gly Ala Gly Leu Tyr Ala Ala Arg		
305	310	315
		320
Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Phe Asp Ile Trp Phe Gln Ser		
	325	330
		335
His Gln Ile Phe His Val Leu Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe		
	340	345
		350
Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly		
	355	360
		365
Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu		
	370	375

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 900

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (897)

&lt;400&gt; 3

atg gaa aaa atg gaa gaa ttt gtt tgt aag gta tgg gaa ggt cgg tgg 48

Met Glu Lys Met Glu Glu Phe Val Cys Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp

1 5 10 15

cga gtg atc cct cat gat gta cta cca gac tgg ctc aag gat aat gac 96

Arg Val Ile Pro His Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp

20 25 30

ttc ctc ttg cat gga cac cgg cct cct atg cct tct ttc cgg gcc tgt 144

Phe Leu Leu His Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys

35 40 45

ttt aag agc att ttc aga ata cac aca gaa aca ggc aac att tgg aca 192

Phe Lys Ser Ile Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr

50 55 60

cat ctc tta ggt tgt gta ttc ttc ctg tgc ctg ggg atc ttt tat atg 240

His Leu Leu Gly Cys Val Phe Phe Leu Cys Leu Gly Ile Phe Tyr Met

65 70 75 80

ttt cgc cca aat atc tcc ttt gtg gcc cct ctg caa gag aag gtg gtc 288

Phe Arg Pro Asn Ile Ser Phe Val Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val

85 90 95

ttt gga tta ttt ttc tta gga gcc att ctc tgc ctt tct ttt tca tgg 336

Phe Gly Leu Phe Phe Leu Gly Ala Ile Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp

100	105	110	
ctc ttc cac aca gtc tac tgc cac tca gag ggg gtc tct cgg ctc ttc			384
Leu Phe His Thr Val Tyr Cys His Ser Glu Gly Val Ser Arg Leu Phe			
115	120	125	
tct aaa ctg gat tac tct ggt att gct ctt ctg att atg gga agt ttt			432
Ser Lys Leu Asp Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe			
130	135	140	
gtt cct tgg ctt tat tat tct ttc tac tgt aat cca caa cct tgc ttc			480
Val Pro Trp Leu Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Phe			
145	150	155	160
atc tac ttg att gtc atc tgt gtg ctg ggc att gca gcc att ata gtc			528
Ile Tyr Leu Ile Val Ile Cys Val Leu Gly Ile Ala Ala Ile Ile Val			
165	170	175	
tcc cag tgg gac atg ttt gcc acc cct cag tat cgg gga gta aga gca			576
Ser Gln Trp Asp Met Phe Ala Thr Pro Gln Tyr Arg Gly Val Arg Ala			
180	185	190	
gga gtg ttt ttg ggc cta ggc ctg agt gga atc att cct acc ttg cac			624
Gly Val Phe Leu Gly Leu Gly Leu Ser Gly Ile Ile Pro Thr Leu His			
195	200	205	
tat gtc atc tcg gag ggg ttc ctt aag gcc gcc acc ata ggg cag ata			672
Tyr Val Ile Ser Glu Gly Phe Leu Lys Ala Ala Thr Ile Gly Gln Ile			
210	215	220	

ggc tgg ttg atg ctg atg gcc agc ctc tac atc aca gga gct gcc ctg 720  
 Gly Trp Leu Met Leu Met Ala Ser Leu Tyr Ile Thr Gly Ala Ala Leu  
 225 230 235 240

tat gct gcc cgg atc ccc gaa cgc ttt ttc cct ggc aaa tgt gac atc 768  
 Tyr Ala Ala Arg Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Cys Asp Ile  
 245 250 255

tgg ttt cac tct cat cag ctg ttt cat atc ttt gtg gtt gct gga gct 816  
 Trp Phe His Ser His Gln Leu Phe His Ile Phe Val Val Ala Gly Ala  
 260 265 270

ttt gtt cac ttc cat ggt gtc tca aac ctc cag gag ttt cgt ttc atg 864  
 Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met  
 275 280 285

atc ggc ggg ggc tgc agt gaa gag gat gca ctg tga 900  
 Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu  
 290 295

<210> 4

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Lys Met Glu Glu Phe Val Cys Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp



1 5 10 15  
Arg Val Ile Pro His Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp  
20 25 30  
Phe Leu Leu His Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys  
35 40 45  
Phe Lys Ser Ile Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr  
50 55 60  
His Leu Leu Gly Cys Val Phe Phe Leu Cys Leu Gly Ile Phe Tyr Met  
65 70 75 80  
Phe Arg Pro Asn Ile Ser Phe Val Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val  
85 90 95  
Phe Gly Leu Phe Phe Leu Gly Ala Ile Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp  
100 105 110  
Leu Phe His Thr Val Tyr Cys His Ser Glu Gly Val Ser Arg Leu Phe  
115 120 125  
Ser Lys Leu Asp Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe  
130 135 140  
Val Pro Trp Leu Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Phe  
145 150 155 160

Ile Tyr Leu Ile Val Ile Cys Val Leu Gly Ile Ala Ala Ile Ile Val  
165 170 175

Ser Gln Trp Asp Met Phe Ala Thr Pro Gln Tyr Arg Gly Val Arg Ala  
180 185 190

Gly Val Phe Leu Gly Leu Gly Leu Ser Gly Ile Ile Pro Thr Leu His  
195 200 205

Tyr Val Ile Ser Glu Gly Phe Leu Lys Ala Ala Thr Ile Gly Gln Ile  
210 215 220

Gly Trp Leu Met Leu Met Ala Ser Leu Tyr Ile Thr Gly Ala Ala Leu  
225 230 235 240

Tyr Ala Ala Arg Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Cys Asp Ile  
245 250 255

Trp Phe His Ser His Gln Leu Phe His Ile Phe Val Val Ala Gly Ala  
260 265 270

Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met  
275 280 285

Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu  
290 295

<210> 5

<211> 1128

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1125)

<400> 5

atg tct tcc cac aaa ggc tct gcc ggg gca caa ggc aat ggg gct cct 48

Met Ser Ser His Lys Gly Ser Ala Gly Ala Gln Gly Asn Gly Ala Pro

1 5 10 15

tct ggt aac aga gaa gct gac aca gtg gag ctg gct gag ctg ggg ccc 96

Ser Gly Asn Arg Glu Ala Asp Thr Val Glu Leu Ala Glu Leu Gly Pro

20 25 30

ctg ctg gag gag aag ggc aag cgg gca gcc agc agc cca gcc aag gct 144

Leu Leu Glu Glu Lys Gly Lys Arg Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Ala

35 40 45

gag gaa gat caa gca tgc cgg gtg cct cag gaa gag gag gag gag gtg 192

Glu Glu Asp Gln Ala Cys Pro Val Pro Gln Glu Glu Glu Glu Val

50 55 60

ogg gtg ctg acg ctt cct ctg caa gcc cac cat gcc atg gag aag atg 240

Arg Val Leu Thr Leu Pro Leu Gln Ala His His Ala Met Glu Lys Met

65 70 75 80

gag gag ttc gtg tat aag gtc tgg gag gga cgt tgg aga gtc atc ccg 288  
 Glu Glu Phe Val Tyr Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp Arg Val Ile Pro

85

90

95

tat gat gtg ctt cct gac tgg ctg aaa gac aac gac tac ctg cta cat 336  
 Tyr Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp Tyr Leu Leu His

100

105

110

ggc cac aga cca cct atg ccc tcc ttt cgg gct tgc ttc aag agc atc 384  
 Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys Phe Lys Ser Ile

115

120

125

ttc cgc atc cac aca gag act ggc aac atc tgg aca cat ctg ctt ggt 432  
 Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr His Leu Leu Gly

130

135

140

ttt gtg cta ttt ctc ttt ctg gga atc ttg acg atg ctg aga cca aat 480  
 Phe Val Leu Phe Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Leu Arg Pro Asn

145

150

155

160

atg tac ttc atg gct ccc ctg cag gag aag gtg gtc ttc ggg atg ttc 528  
 Met Tyr Phe Met Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val Phe Gly Met Phe

165

170

175

ttc ctg ggc gcg gtg ctc tgc ctc agt ttc tcc tgg ctc ttc cac act 576  
 Phe Leu Gly Ala Val Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp Leu Phe His Thr

180

185

190

gtc tac tgt cat tca gag aag gtc tct cgg act ttt tcc aaa ctg gac 624

Val Tyr Cys His Ser Glu Lys Val Ser Arg Thr Phe Ser Lys Leu Asp

195

200

205

tat tca ggg att gct cta ctg att atg ggg agc ttc gtt ccc tgg ctc 672

Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe Val Pro Trp Leu

210

215

220

tat tac tcc ttc tac tgc tcc cca cag ccg cgg ctc atc tac ctc tcc 720

Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Ser Pro Gln Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Ser

225

230

235

240

atc gtc tgt gtc ctg ggc atc tct gcc atc att gtg gca cag tgg gac 768

Ile Val Cys Val Leu Gly Ile Ser Ala Ile Ile Val Ala Gln Trp Asp

245

250

255

cgg ttt gcc act ccc aag cac cgg cag aca aga gca gga gtg ttc ctg 816

Arg Phe Ala Thr Pro Lys His Arg Gln Thr Arg Ala Gly Val Phe Leu

260

265

270

gga ctt ggc ttg agt ggt gtt gta ccc acc atg cac ttt act atc gct 864

Gly Leu Gly Leu Ser Gly Val Val Pro Thr Met His Phe Thr Ile Ala

275

280

285

gag ggc ttt gtc aag gcc acc acg gtg ggc cag atg ggc tgg ttc ttc 912

Glu Gly Phe Val Lys Ala Thr Thr Val Gly Gln Met Gly Trp Phe Phe

290

295

300

ctc atg gct gtg atg tac atc acc ggc gcc ggc ctg tat gct gct cgg 960

Leu Met Ala Val Met Tyr Ile Thr Gly Ala Gly Leu Tyr Ala Ala Arg

305	310	315	320	
att cct gag cgc ttc ttc cct gga aaa ttt gac atc tgg ttc cag tct				1008
Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Phe Asp Ile Trp Phe Gln Ser				
	325	330	335	
cat cag att ttc cac gtc ctg gtg gtg gca gca gct ttc gtc cac ttc				1056
His Gln Ile Phe His Val Leu Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe				
	340	345	350	
tat ggt gtg tcc aac ctt cag gaa ttc cgt tat ggc cta gaa ggt ggc				1104
Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly				
	355	360	365	
tgt acc gac gac tcc ctt ctc tga				1128
Cys Thr Asp Asp Ser Leu Leu				
	370	375		

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Met Ser Ser His Lys Gly Ser Ala Gly Ala Gln Gly Asn Gly Ala Pro

1

5

10

15

Ser Gly Asn Arg Glu Ala Asp Thr Val Glu Leu Ala Glu Leu Gly Pro

20	25	30
Leu Leu Glu Glu Lys Gly Lys Arg Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Ala		
35	40	45
Glu Glu Asp Gln Ala Cys Pro Val Pro Gln Glu Glu Glu Glu Val		
50	55	60
Arg Val Leu Thr Leu Pro Leu Gln Ala His His Ala Met Glu Lys Met		
65	70	75
80		
Glu Glu Phe Val Tyr Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp Arg Val Ile Pro		
85	90	95
Tyr Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp Tyr Leu Leu His		
100	105	110
Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys Phe Lys Ser Ile		
115	120	125
Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr His Leu Leu Gly		
130	135	140
Phe Val Leu Phe Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Leu Arg Pro Asn		
145	150	155
160		
Met Tyr Phe Met Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val Phe Gly Met Phe		
165	170	175

Phe Leu Gly Ala Val Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp Leu Phe His Thr  
180 185 190

Val Tyr Cys His Ser Glu Lys Val Ser Arg Thr Phe Ser Lys Leu Asp  
195 200 205

Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe Val Pro Trp Leu  
210 215 220

Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Ser Pro Gln Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Ser  
225 230 235 240

Ile Val Cys Val Leu Gly Ile Ser Ala Ile Ile Val Ala Gln Trp Asp  
245 250 255

Arg Phe Ala Thr Pro Lys His Arg Gln Thr Arg Ala Gly Val Phe Leu  
260 265 270

Gly Leu Gly Leu Ser Gly Val Val Pro Thr Met His Phe Thr Ile Ala  
275 280 285

Glu Gly Phe Val Lys Ala Thr Thr Val Gly Gln Met Gly Trp Phe Phe  
290 295 300

Leu Met Ala Val Met Tyr Ile Thr Gly Ala Gly Leu Tyr Ala Ala Arg  
305 310 315 320

Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Phe Asp Ile Trp Phe Gln Ser  
325 330 335



His Gln Ile Phe His Val Leu Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe  
340 345 350

Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly  
355 360 365

Cys Thr Asp Asp Ser Leu Leu  
370 375

<210> 7

<211> 936

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (933)

<400> 7

atg ggc atg tcc ccg ctc cta cag gcc cat cat gct atg gaa cga atg 48  
Met Gly Met Ser Pro Leu Leu Gln Ala His His Ala Met Glu Arg Met  
1 5 10 15

gaa gag ttt gtt tgt aag gtg tgg gaa ggc cga tgg cga gtg atc cct 96  
Glu Glu Phe Val Cys Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp Arg Val Ile Pro  
20 25 30

cac gat gtg cta ccg gat tgg ctt aag gat aat gac ttc ctt ctc cat 144

His Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp Phe Leu Leu His

35

40

45

gga cac cgg cct cct atg cct tcc ttt cgg gcc tgt ttt aag agc att 192

Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys Phe Lys Ser Ile

50

55

60

ttt aga ata cac aca gag acg ggc aac att tgg aca cat ctc cta ggt 240

Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr His Leu Leu Gly

65

70

75

80

tgt gta ttc ttc ctg tgc ctg ggg atc ttt tat atg ttt cgc cca aat 288

Cys Val Phe Phe Leu Cys Leu Gly Ile Phe Tyr Met Phe Arg Pro Asn

85

90

95

ata tct ttt gtg gcc cct ctg caa gag aaa gtg gtc ttt ggc ttg ttc 336

Ile Ser Phe Val Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val Phe Gly Leu Phe

100

105

110

ttc ttg gga gcc att ctc tgc ctt tcc ttt tca tgg ctc ttc cac acg 384

Phe Leu Gly Ala Ile Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp Leu Phe His Thr

115

120

125

gtg tac tgc cac tca gaa ggg gtc tcc cga ctc ttc tct aaa ttg gat 432

Val Tyr Cys His Ser Glu Gly Val Ser Arg Leu Phe Ser Lys Leu Asp

130

135

140

tac tct ggt att gct ctt ctg atc atg gga agt ttt gtt cct tgg ctt 480

Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe Val Pro Trp Leu  
145 150 155 160

tat tat tct ttc tac tgt aac cca caa cct tgc ttc atc tac ctg att 528  
Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Phe Ile Tyr Leu Ile  
165 170 175

gtc atc tgt gtg ctg ggc att gca gcc att atc gtc tct cag tgg gac 576  
Val Ile Cys Val Leu Gly Ile Ala Ala Ile Ile Val Ser Gln Trp Asp  
180 185 190

atg ttt gcc acc cct cag tat cgg ggg gtc aga gca gga gtg ttc gtg 624  
Met Phe Ala Thr Pro Gln Tyr Arg Gly Val Arg Ala Gly Val Phe Val  
195 200 205

ggc tta ggc ctg agt gga atc atc cct acc ttg cat tat gtc atc tca 672  
Gly Leu Gly Leu Ser Gly Ile Ile Pro Thr Leu His Tyr Val Ile Ser  
210 215 220

gaa ggg ttc ctg aag gct gcc acc ata ggg cag ata ggc tgg cta atg 720  
Glu Gly Phe Leu Lys Ala Ala Thr Ile Gly Gln Ile Gly Trp Leu Met  
225 230 235 240

ctt atg gct agc ctc tat atc acc gga gct gcc ctc tat gcg gcc cgt 768  
Leu Met Ala Ser Leu Tyr Ile Thr Gly Ala Ala Leu Tyr Ala Ala Arg  
245 250 255

atc cct gag cgc ttc ttt cct ggc aaa tgt gac atc tgg ttt cac tct 816  
Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Cys Asp Ile Trp Phe His Ser

260

265

270

cat cag ctc ttc cac atc ttt gtg gtt gct ggt gcc ttt gtt cac ttc 864

His Gln Leu Phe His Ile Phe Val Val Ala Gly Ala Phe Val His Phe

275

280

285

cac gga gtc tca aac ctg cag gaa ttt cgt ttc atg att ggc ggg ggc 912

His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly

290

295

300

tgc act gaa gag gat gca ctg tga

936

Cys Thr Glu Glu Asp Ala Leu

305

310

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 311

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 8

Met Gly Met Ser Pro Leu Leu Gln Ala His His Ala Met Glu Arg Met

1

5

10

15

Glu Glu Phe Val Cys Lys Val Trp Glu Gly Arg Trp Arg Val Ile Pro

20

25

30

His Asp Val Leu Pro Asp Trp Leu Lys Asp Asn Asp Phe Leu Leu His

35

40

45

Gly His Arg Pro Pro Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys Phe Lys Ser Ile

50

55

60

Phe Arg Ile His Thr Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr His Leu Leu Gly

65

70

75

80

Cys Val Phe Phe Leu Cys Leu Gly Ile Phe Tyr Met Phe Arg Pro Asn

85

90

95

Ile Ser Phe Val Ala Pro Leu Gln Glu Lys Val Val Phe Gly Leu Phe

100

105

110

Phe Leu Gly Ala Ile Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp Leu Phe His Thr

115

120

125

Val Tyr Cys His Ser Glu Gly Val Ser Arg Leu Phe Ser Lys Leu Asp

130

135

140

Tyr Ser Gly Ile Ala Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe Val Pro Trp Leu

145

150

155

160

Tyr Tyr Ser Phe Tyr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Phe Ile Tyr Leu Ile

165

170

175

Val Ile Cys Val Leu Gly Ile Ala Ala Ile Ile Val Ser Gln Trp Asp

180

185

190

Met Phe Ala Thr Pro Gln Tyr Arg Gly Val Arg Ala Gly Val Phe Val

195

200

205

Gly Leu Gly Leu Ser Gly Ile Ile Pro Thr Leu His Tyr Val Ile Ser

210

215

220

Glu Gly Phe Leu Lys Ala Ala Thr Ile Gly Gln Ile Gly Trp Leu Met

225

230

235

240

Leu Met Ala Ser Leu Tyr Ile Thr Gly Ala Ala Leu Tyr Ala Ala Arg

245

250

255

Ile Pro Glu Arg Phe Phe Pro Gly Lys Cys Asp Ile Trp Phe His Ser

260

265

270

His Gln Leu Phe His Ile Phe Val Val Ala Gly Ala Phe Val His Phe

275

280

285

His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly

290

295

300

Cys Thr Glu Glu Asp Ala Leu

305

310

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07515

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/72, C07K16/28, C12N5/10 //  
(C07K14/72, C12R1:91), (C12N5/10, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/72, C07K16/28, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	YAMAUCHI, T. et al., 'Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects', Nature, Vol.423, 2003, pages 762 to 769	1-8
X/A	WO 01/12662 A2 (Incyte Genomics Inc.), 22 February, 2001 (22.02.01), & EP 126543 A	1-6/7,8
X/A	WO 01/90304 A2 (Human Genome Sciences, Inc.), 29 November, 2001 (29.11.01), & US 6346396 B1	1-6/7,8
X/A	WO 01/57190 A2 (Hyseq Inc.), 09 August, 2001 (09.08.01), & EP 1101113 A & US 6187267 B1	1-6/7,8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 August, 2003 (21.08.03)

Date of mailing of the international search report  
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/07515

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2002-191363 A (Helix Research Institute), 09 July, 2002 (09.07.02), (Family: none)	1-6/7, 8
X/A	EP 1074617 A2 (Helix Research Institute), 07 February, 2001 (07.02.01), & WO 01/09315 A1 & JP 2002-171977 A	1-6/7, 8



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/72, C07K16/28, C12N5/10 //(C07K14/72, C12R1:91), (C12N5/10, C12R 1:91)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/72, C07K16/28, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	Yamauchi T et al., 'Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects', Nature, Vol. 423, 2003, p. 762-769	1-8
X/A	WO 01/12662 A2 (Incyte Genomics Inc), 2001.02.22, & EP 126543 A	1-6/7, 8
X/A	WO 01/90304 A2 (Human Genome Sciences, Inc), 2001.11.29 & US 6346396 B1	1-6/7, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.08.03

国際調査報告の発送日

15.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 01/57190 A2 (Hyseq Inc), 2001.08.09, & EP 1101113 A & US 6187267 B1	1-6/7, 8
X/A	特開2002-191363 A (株式会社ヘリックス研究所), 2002.07.09, ファミリーなし	1-6/7, 8
X/A	EP 1074617 A2 (Helix Research Institute), 2001.02.07, & WO 01/09315 A1 & JP 2002-171977 A	1-6/7, 8